

Untersuchung der Dynamik von Transportrezeptoren
an der Kernpore mittels kontrastverstärkter
Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Andreas Veenendaal
aus
Fürth

Bonn, Juni 2013

Angefertigt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter:	Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter:	Prof. Dr. Rudolf Merkel
Tag der Promotion:	26.08.2013
Erscheinungsjahr:	2013

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Biologische Grundlagen	3
2.1.1	Zelle und Kernporenkomplex	4
2.1.2	Kern-Zytoplasma-Transport	6
2.2	Motivation	8
2.3	Übersicht über die Kapitel	11
3	Grundlagen	13
3.1	Der Einzelmolekül-Mikroskop-Aufbau	13
3.2	Fluoreszenz	15
3.3	Spezielle Beleuchtungsmethoden	16
3.3.1	Totale Interne Reflexion Fluoreszenzmikroskopie	16
3.3.2	<i>Highly Inclined Laminated Optical Sheet</i> Mikroskopie	23
4	Charakterisierung des Aufbaus	29
4.1	Erweiterung des Einzelmolekül-Aufbaus um eine TIRF/HILO Beleuchtung	29
4.2	Charakterisierung der HILO-Beleuchtung	30
4.2.1	Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses	31
4.2.2	Ausdehnung des HILO-Strahls	32
4.3	Die Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang	39
4.3.1	Kalibration der z-Positions-Bestimmung	39
4.3.2	Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung	43
4.3.3	Berechnung von z-Positionen und Abständen	44
4.4	Bestimmung der axialen chromatischen Aberration des Aufbaus	44
5	Material und Methoden	49
5.1	Biochemische Methoden	49
5.1.1	Verwendete Zelllinie	49

5.1.2	Zellkultur	49
5.1.3	Untersuchte Transportrezeptoren	50
5.1.4	Proteinmarkierung	50
5.1.5	Funktionalität der Transportrezeptoren	51
5.1.6	Präparation der Zellen	52
5.1.7	Präparation der Zellproben	52
5.1.8	Zusammensetzung der verwendeten Proben	53
5.2	Durchführung der Experimente	53
5.3	Auswertung der Bildstapel	55
5.3.1	Bestimmung der Intensitätszeitreihe über den Kernporen	55
5.3.2	Anpassung einer 2D-Gaußfunktion an die Bindungsereignisse	57
5.3.3	Selektion der Bindungsereignisse	58
6	Ergebnisse	61
6.1	Bestimmung der Verweilzeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore	62
6.1.1	Untersuchte Transportprozesse	63
6.1.2	Bestimmung der mittleren Bindungszeiten	63
6.1.3	Einfluss des Schwellenwertfaktors auf die Ergebnisse	65
6.2	Bindungszeiten der Transportrezeptoren an der Kernpore	68
6.3	Lokalisierungsgenauigkeit der Transportrezeptoren	71
6.3.1	Lokalisierungsgenauigkeit in lateraler Richtung	71
6.3.2	Lokalisierungsgenauigkeit in axialer Richtung	73
6.4	Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren	73
6.4.1	Radiale Verteilung bindender Transportrezeptoren	74
6.4.2	Axiale Verteilung bindender Transportrezeptoren	76
7	Diskussion	79
7.1	Bindungszeiten verschiedener Transportrezeptoren an der Kernpore	80
7.2	Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren	82
7.2.1	Axiale Verteilungen	82
7.2.2	Radiale Verteilungen	83
7.3	Fazit und Ausblick	84
	Literaturverzeichnis	87
	Abkürzungsverzeichnis	95
	Abbildungsverzeichnis	97

Tabellenverzeichnis	101
Danksagung	103

1 Zusammenfassung

Der Austausch von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma findet für Proteine mit einer Masse größer als 40kDa durch den Kernporenkomplex statt. Import- und Exportfaktoren binden an Kernlokalisierungs- bzw. Kernexportsequenzen bestimmter Proteine und ermöglichen den Transport durch die Kernpore. Die genaue Funktionsweise des Kern-Zytoplasma-Transports ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In dieser Arbeit wurde ein Mikroskopaufbau mit TIRF- und HILO-Beleuchtung realisiert, welcher die Abbildung von supramolekularen Komplexen in situ mit Nanometerauflösung und im Millisekundenbereich ermöglicht. Der HILO-Strahl beleuchtet einen nur wenige Mikrometer dicken Bereich innerhalb einer Probe, wodurch eine deutliche Verbesserung des Kontrastes der Abbildung erreicht wird. Es wurde die Ausdehnung des HILO-Strahls für verschiedene Wellenlängen und unter Verwendung verschiedener Feldblenden bestimmt. Weiterhin wurde eine Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang eingefügt, welche die axiale Position eines Partikels in der PSF kodiert. Dadurch ist die Bestimmung der Position eines abgebildeten Partikels in allen drei Raumrichtungen möglich.

Mit dem Aufbau wurden die dynamischen Eigenschaften der Transportrezeptoren NTF2, Imp β 1 und Imp β 2 am Kernporenkomplex untersucht. Das Verhalten der Rezeptoren wurde sowohl im freien als auch im substratgebundenen Zustand analysiert. Dazu wurden die Substrate RanGDP, GST-NLS und M3-GST verwendet. Die Transportrezeptoren wurden mit fluoreszenten Farbstoffen markiert und in permeabilisierten HeLa-Zellen untersucht. Es wurde die Bindungsdauer an der Kernpore gemessen und die räumliche Verteilung der Transportrezeptoren an der Pore bestimmt.

Die gefundenen Ergebnisse zur Bindungszeit an der Kernpore bestätigen die in früheren Studien aufgestellte Vermutung, dass substratgebundene Transportrezeptoren kürzere Bindungszeiten an der Kernpore aufweisen. Für die Rezeptoren NTF2 und Imp β 2 wurden Bindungszeiten von 3,4ms und 2,9ms für den freien, bzw. 2,8ms und 2,4ms für den substratgebundenen Zustand gemessen. Für Imp β 1 konnte nur ein sehr geringer Unterschied festgestellt werden. Die gemessenen Verteilungen der Bindungsstellen von Transportrezeptoren entlang der Symmetrieachse der Kernpore sind in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus bisherigen Studien. Die radialen Verteilungen der Bindungsstellen unterstützen zuvor gefundene Ergebnisse, wonach Rezeptoren beim Transport durch die Pore am Rand des Porenkanals binden.

2 Einleitung

Die Mikroskopie ermöglicht das Studium von Organismen und anorganischen Objekten im Submillimeter-Bereich. Insbesondere in der Zellbiologie hat die Mikroskopie seit Mitte des 19. Jahrhunderts zu großen Fortschritten im Verständnis des Aufbaus und der Funktionsweise von Zellen geführt. In den letzten Jahrzehnten hat sich die Fluoreszenzmikroskopie als eine der wichtigsten Methoden in der Lichtmikroskopie etabliert. Sie nutzt die Fluoreszenzeigenschaften bestimmter natürlicher (z.B. das *Green Fluorescent Protein* (GFP) [Heim 95]) und modifizierter Proteine, um selektiv Prozesse und Strukturen im Zellinneren sichtbar zu machen.

Die Lichtmikroskopie, welche anders als z.B. die Elektronenmikroskopie auch an lebenden Organismen durchgeführt werden kann, besitzt ein begrenztes Auflösungsvermögen, welches von der Wellenlänge abhängt. Für sichtbare Wellenlängen liegt sie bei einigen hundert Nanometern. Im Zuge der immer stärkeren Verbreitung der Fluoreszenzmikroskopie gab es in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten große Fortschritte beim Auflösungsvermögen, dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und der Abbildungseffizienz und -geschwindigkeit. Methoden wie z.B. photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (*Photoactivated Localization Microscopy*, PALM) und Stimulierte-Emissionsverringere-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*, STED) erreichen Lokalisierungsgenauigkeiten im Bereich von wenigen Nanometern [Hell 94, Betz 06]. Hierzu werden Farbstoffmoleküle einzeln zur Emission angeregt und deren Positionen jeweils aus dem Airy-Scheibchen ermittelt (PALM), bzw. durch stimulierte Emission alle Farbstoffmoleküle „ausgeschaltet“, welche nicht genau im Fokuspunkt liegen (STED). Diese Methoden setzen allerdings oft möglichst immobile Proben und lange Aufnahmezeiten voraus. Beleuchtungstechniken wie z.B. Lichtscheibenmikroskopie (*Selective Plane Illumination Microscopy*, SPIM) und Totalreflexions-Mikroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)*, TIRF) bilden Ereignisse im Zellinneren in hoher Geschwindigkeit und mit sehr gutem Kontrast ab [Huis 04, Axel 84], erreichen dabei aber nicht das hohe Auflösungsvermögen der oben genannten Methoden.

2.1 Biologische Grundlagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kern-Zytoplasma-Transport an einer humanen Zelllinie (HeLa) mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Im folgenden soll zunächst kurz der Aufbau eukaryotischer Zellen sowie des Kernporenkomplexes beschrieben werden. Auch wird

auf die verschiedenen vorhandenen Modelle zur Funktionsweise des Transports von Proteinen durch die Kernpore zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma eingegangen.

2.1.1 Zelle und Kernporenkomplex

Die äußere Hülle eukaryotischer Zellen bildet die Zellmembran, welche die Zelle von ihrer Umgebung abgrenzt (siehe Abb. 2.1). Das Innere der Zelle ist in zwei Kompartimente unterteilt. Zum einen das Zytoplasma, welches unter anderem die Mitochondrien, den Golgi-Apparat sowie das glatte und das raue endoplasmatische Retikulum enthält. Zum anderen der Zellkern, welcher vom Rest der Zelle durch eine Doppelmembran abgegrenzt ist. Er enthält das Nukleoplasma, in dem auch die DNA, als Chromosomen organisiert, vorliegt.

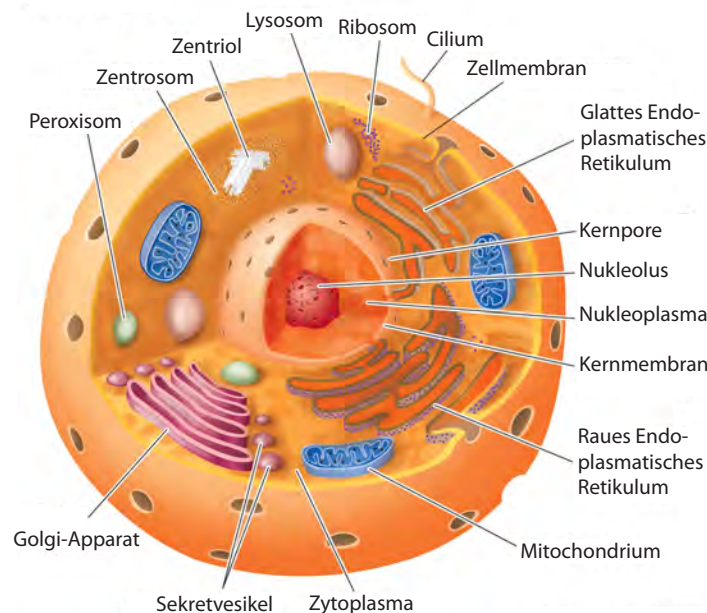


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer eukaryotischen Zelle (modifiziert, aus [Albe 08]).

In der Doppelmembran des Zellkerns, der Kernmembran, befinden sich die sogenannten Kernporenkomplexe (*Nuclear Pore Complex*, NPC). Durch diese Kernporen wird die z.B. die mRNA, welche im Zellkern transkribiert wurde, aus diesem in das Zytoplasma und damit zum Ribosom transportiert. Ebenso werden z.B. Transkriptionsfaktoren, Histone, Polymerasen und RanGDP, welches für die Funktionalität des Kern-Zytoplasma-Transports eine entscheidende Rolle spielt, aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert.

Eine Kernpore ist ein Proteinkomplex mit einer Molekülmasse von ca. 125 MDa [Reic 90, Cron 02]. Er besteht aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (Nups) [Rout 00]. Der Durchmesser des Kernporenkomplexes beträgt ca. 125nm, die Höhe ca. 70nm und

2.1 Biologische Grundlagen

der innere Kanal hat einen Durchmesser von ca. 50nm [Kahm 11]. Durch diese Öffnung können Proteine bis zu einer Masse von ca. 40kDa durch Brown'sche Molekularbewegung diffundieren, wobei die Pore dabei wie ein molekulares Sieb mit einer Porengröße von 10nm wirkt [Kemi 99]. Größere Proteine bis zu einem Durchmesser von ca. 40nm aber benötigen zum Transport durch die Kernpore einen sogenannten Transportrezeptor [Pant 02]. Solche Transportrezeptoren ermöglichen es verschiedenen Zellproteinen eine Kernpore zu passieren.

An der zytoplasmatischen Seite der Kernpore befinden sich die zytoplasmatischen Filamente, welche aus Nukleoporinen bestehen, und ca. 50nm in das Zytoplasma ragen (siehe Abb. 2.2). Auf der nukleoplasmatischen Seite sind ebenfalls Filamente vorhanden welche hier aber in ca 60nm Abstand durch einen Ring zusammengehalten werden und eine Korbstruktur im Kern (*Nuclear Basket*) bilden [Lim 06, Yang 98]. Sowohl die zytoplasmatischen Filamente als auch der *Nuclear Basket* besitzen Bindungsstellen an denen die Transportrezeptoren, welche den Transport von Proteinen durch die Kernpore vereinfachen, binden können [Kubi 05, Kahm 11, Pete 07].

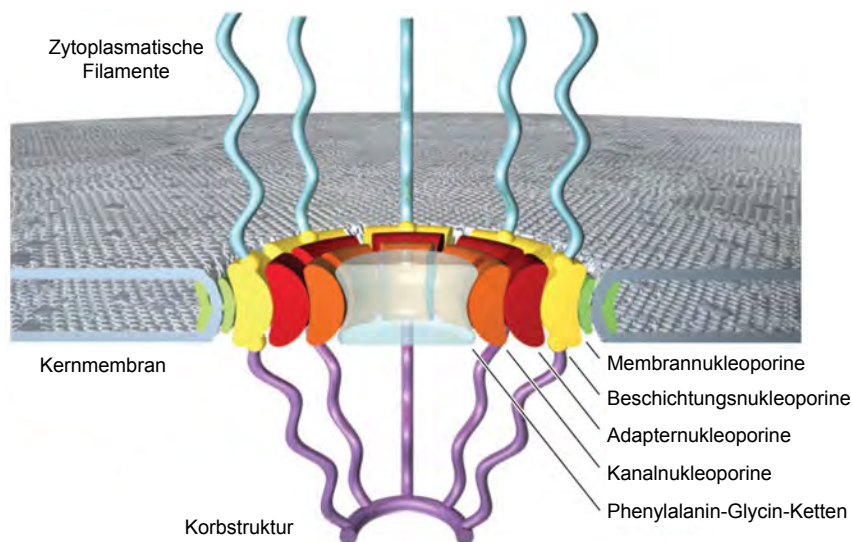


Abbildung 2.2: Skizze des Kernporenkomplexes und seiner Bestandteile (Grafik modifiziert nach [Hoel 11]).

Die ringartige Struktur des Kernporenkomplexes, der eine achtfache Symmetrie um die Rotationsachse besitzt, lässt sich in vier Bereiche unterteilen (siehe Abb. 2.2): integrale Membranproteine (*Pore Membrane Protein*, POM) verankern den Kernporenkomplex in der Kernmembran. An diese schließen sich die Beschichtungs-Proteine an welche mittels der Adapterproteine mit den Kanalproteinen verbunden werden. Die Nups welche den Kanal bilden besitzen sich wiederholende Phenylalanin-Glycin Ketten (FG-repeats) welche die Translokation von Proteinen durch die Pore beeinflussen. Die Bedeutung der FG-Repeats im Kern-Zytoplasma-Transport ist zurzeit noch nicht genau bestimmt, es gibt aber verschiedene Modelle denen zufolge die FG-Repeats den

Transport von Proteinen durch die Kernpore mittels Transportrezeptoren ermöglichen bzw. die Translokation großer/inerter Proteine verhindern [Hoel 11].

2.1.2 Kern-Zytoplasma-Transport

Der Kernporenkomplex sorgt für den Austausch von bestimmten Proteinen zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma (siehe Abb. 2.3) [Gorl 96]. Besitzen diese Proteine eine Masse die größer ist als ca. 40kDa müssen sie dazu an einen Transportrezeptor binden, welcher den Durchgang durch die Kernpore ermöglicht. Transportrezeptoren, die sogenannten *Karyopherine* (von griech. karyon für Kern, und pherein für tragen, überbringen), kommen in zwei Varianten vor; Importfaktoren und Exportfaktoren.

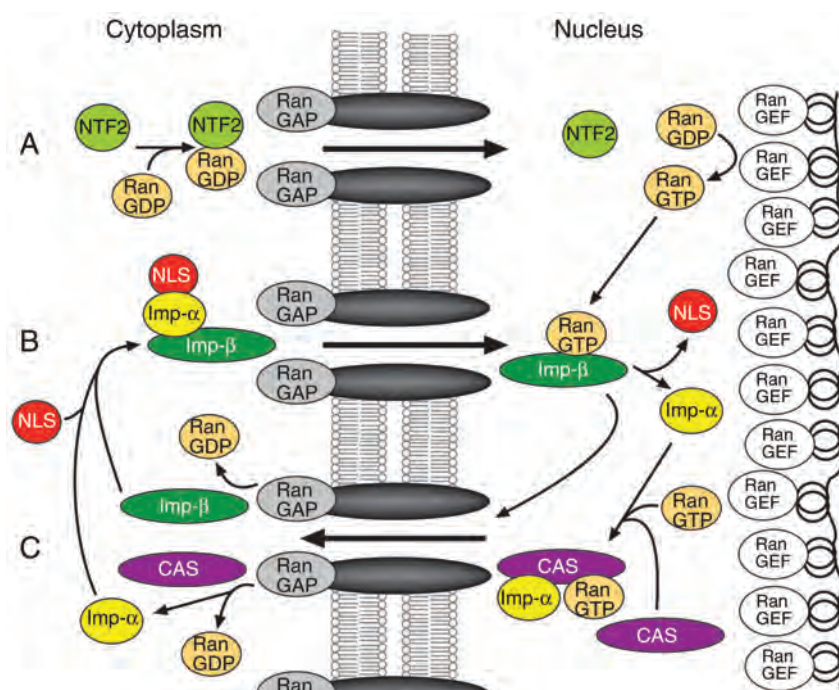


Abbildung 2.3: Verschiedene Transportzyklen des Kern-Zytoplasma-Transports (Grafik modifiziert nach [Pemb 05]).

Bestimmte Proteine besitzen ein sogenanntes Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localization Signal, NLS*), eine Sequenz von Aminosäuren welche vom Transportrezeptor erkannt werden. Dieser bindet direkt oder über einen sekundären Transportrezeptor an das Protein und bildet einen Transportkomplex. Nach dem Passieren der Kernpore sorgt Bindung an RanGTP (Ran-Guanosintriphosphat) dafür, dass sich das Importin wieder vom Kernlokalisierungssignal löst und somit im Zellkern freigesetzt wird (siehe Abb. 2.3 B).

Besitzt ein Protein ein nukleäres Export-Signal (*Nuclear Export Signal, NES*) kann es mit

2.1 Biologische Grundlagen

einem Exportfaktor, z.B. CAS, interagieren. CAS bildet zusammen mit RanGTP und dem Protein einen Exportkomplex. Nach dem Transport durch die Kernpore wird RanGTP an einem GTPase aktivierenden Protein (*GTPase Activating Protein*, RanGAP) in RanGDP (Ran-Guanosindiphosphat) umgewandelt, dadurch der Komplex der drei Proteine gelöst und das zu exportierende Protein im Zytoplasma freigesetzt (siehe Abb. 2.3 C).

RanGDP wird vom Transportrezeptor NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*) aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert (siehe Abb. 2.3 A) [Bayl 99, Chai 00]. Dort wird RanGDP durch die ans Chromatin gebundenen Guanosinnukleotid-Austausch-Faktoren (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*, RanGEF) in RanGTP umgewandelt, welches dann wieder zur Dissoziation von Importkomplexen und zum Export zur Verfügung steht.

Die genaue Funktionsweise der Interaktionen zwischen FG-Repeats und Transportkomplexen während eines Im- oder Exports sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Laufe der letzten Jahre sind aber verschiedene Experimente durchgeführt worden, welche zu folgenden Modellen für den Kern-Zytoplasma-Transport geführt haben:

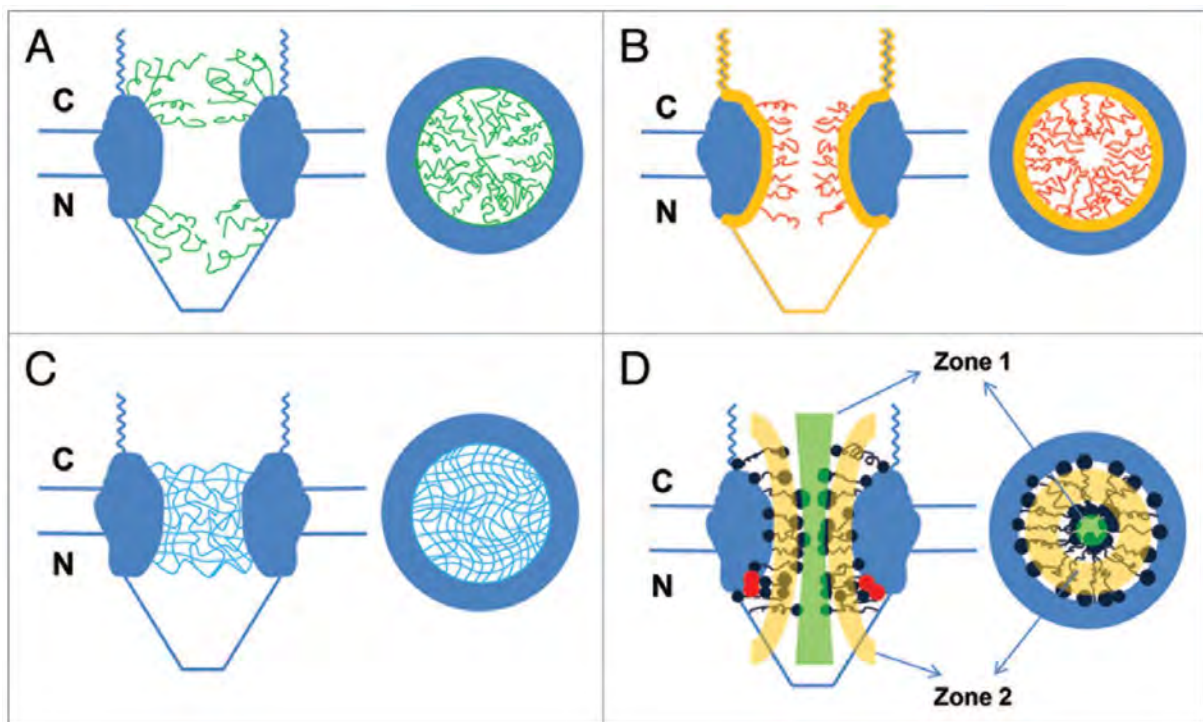


Abbildung 2.4: Skizzen verschiedener Modelle des Kern-Zytoplasma-Transports (Grafik übernommen aus [Yang 11]). A *Brownian Affinity / Virtual Gating Model*, B *Reduction of Dimensionality*, C *Selective Phase Model*, D *Forest Model*. In den Abbildungen steht C für das Zytoplasma, N für das Nukleoplasma.

Brownian Affinity / Virtual Gating Model ([Rout 03], siehe Abb. 2.4 A): In diesem Modell

bilden die FG-Repeats ein Netzwerk und vollführen thermische Bewegungen. Diese Bewegungen verhindern, dass Proteine, die größer sind als die Maschengröße zwischen den einzelnen FG-Repeats, daran in den inneren Kanal der Kernpore einzudringen. Transportrezeptoren und Proteine, welche an Transportrezeptoren gebunden sind, können sich durch das Geflecht der FG-Repeats bewegen, da die Transportrezeptoren Bindungsstellen besitzen, die mit den zugehörigen Bindungsstellen an den FG-Repeats wechselwirken. Durch sich schnell bildende und wieder lösende Bindungen mit den FG-Repeats können die Transportrezeptoren/Transportkomplexe so die Kernpore passieren.

Reduction of Dimensionality ([Pete 05], siehe Abb. 2.4 B): Hier liegen die Bindungsstellen für die Transportrezeptoren an den Innenwänden des inneren Kanals durch die Pore. Dadurch wird die dreidimensionale Bewegung durch die Pore auf eine zweidimensionale Bewegung entlang der Kanalinnenwand der Pore reduziert und dadurch die Wahrscheinlichkeit für eine Translokation durch die Pore erhöht.

Selective Phase Model ([Ribb 01], siehe Abb. 2.4 C): Die FG-Repeats verbinden sich in diesem Modell an ihren Bindungsstellen untereinander und bilden ein Hydrogel. Dieses ist für alle Proteine die größer als die Maschengröße dieses Geflechts sind undurchlässig. Transportrezeptoren und Transportkomplexe, welche mit denselben Bindungsstellen interagieren, welche die FG-Repeats zusammenhalten, können diese Verbindungen lösen und somit das Hydrogel durchlässig machen.

Forest Model ([Yama 10], siehe Abb. 2.4 D): In diesem Modell liegen die FG-Repeats in zwei Konformationen vor: einer kollabierten und einer ausgedehnten Windung (*collapsed coil*, *extended coil*). Ein ausgedehnter FG-Repeat, ausgehend von der Wand des inneren Kanals der Kernpore, an dessen Ende sich ein kollabierter FG-Repeat befindet, stellt in diesem Modell einen „Baum“ dar. Viele dieser „Bäume“ bilden einen inneren Kanal in der Mitte der Kernpore (Zone 1) durch welchen vor allem große Substrate nach dem *Selective Phase Model* transportiert werden. Die sogenannten „Büsche“ bestehend aus kollabierten FG-Repeats und die ausgedehnten FG-Repeats der „Bäume“ bilden die Zone 2. In dieser findet vermutlich der Transport freier und substratgebundener Transportrezeptoren statt.

2.2 Motivation

In eukaryotischen Zellen findet der Transport von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma durch den Kernporenkomplex (*Nuclear Pore Complex* (NPC)) statt. Die Kernporenkomplexe sind über die gesamte Oberfläche des Zellkerns verteilt. Eine wichtige Fragestellung in der aktuellen Forschung ist die genaue Funktionsweise des Transports von Proteinen durch die Kernpore. Wichtige Größen zum Verständnis des Transportprozesses sind dabei dessen Dauer und die Lage der Bindungsstellen von Transportrezeptoren und Substraten innerhalb und außerhalb der

2.2 Motivation

Kernpore.

Zur Untersuchung von Transportprozessen an der Kernpore werden Kernporen und Transportrezeptoren mit fluoreszenten Proteinen markiert. Mit einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop (hohe Lichtempfindlichkeit, hohe Bildaufnahmeraten) können somit Einzelmolekülprozesse abgebildet werden. In bisherigen Studien wurde die Fokusebene des Mikroskopobjektivs dazu zumeist in die Äquatorebene des Zellkerns gelegt [Yang 04, Kubi 05, Yang 06, Dang 08]. Dadurch können Zytoplasma, Kernpore und Nukleoplasma nebeneinanderliegend abgebildet werden, und die Aufnahme eines kompletten Transportprozesses durch die Pore ist theoretisch gut möglich (siehe Abb. 2.5, links). Es besteht allerdings die Möglichkeit der Überlappung einzelner Kernporen im Bild, wodurch die genaue Differenzierung einzelner Poren erschwert wird. Ebenso besteht eine Unsicherheit über die z-Position von in der Nähe der Kernpore abgebildeten Transportrezeptoren, und somit über den axialen (in Beobachtungsrichtung) Abstand zwischen Kernpore und Rezeptor. Eine alternative Methode von [Ma 10] ermöglicht hohe zeitliche und räumliche Auflösungen (0,4ms bzw. 9nm), betrachtet dabei aber immer nur eine Kernpore pro Messung.

In dieser Arbeit wurde die Fokusebene des Mikroskopobjektivs auf die dem Deckglas zugewandte Unterseite des Zellkerns gelegt (siehe Abb. 2.5, rechts). Hierdurch wird zum einen die Analyse einzelner Kernporen sichergestellt, zum anderen wird auch eine genaue Kolokalisation von Transportrezeptor und Kernpore in der x-y-Ebene möglich. Durch die simultane Abbildung vieler Kernporenkomplexe können mit einer Messung auch mehr Daten gewonnen werden, als mit den bisherigen Methoden.

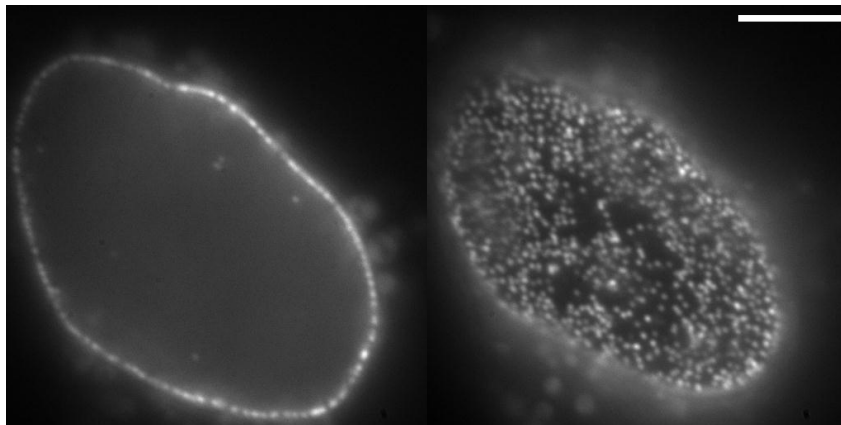


Abbildung 2.5: Aufnahmen einer HeLa-Zelle deren Kernporen mit GFP markiert sind. Links: Fokusebene am Äquator der Zelle, rechts: Fokusebene an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns. Balken = 5µm

Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurde eine Totalreflexionsbeleuchtung (Totale Interne Reflektions Fluoreszenzmikroskopie, TIRF) und eine „geneigte Lichtscheiben“-Beleuchtung (*Highly Inclined Laminated Optical Sheet*, HILO, [Toku 08]) an einem inversen Lichtmikroskop

realisiert. Bei der TIRF-Beleuchtung tritt ein exponentiell abklingendes Feld nur wenige hundert Nanometer in die Probe oberhalb der Grenzschicht zwischen Deckglas und Probe ein. Dadurch wird nur in einer sehr kleinen Schicht über dem Deckglas Fluoreszenz angeregt und das Hintergrundsignal somit stark reduziert. Die Eindringtiefe dieses evaneszenten Feldes reicht allerdings nicht aus um die dem Deckglas zugewandte Seite der Kernmembran zu erreichen, daher wird in den Experimenten die HILO-Beleuchtung verwendet. Dabei tritt der Strahl unter einem sehr großen Winkel zur optischen Achse aus dem Deckglas aus, und beleuchtet einen nur wenige Mikrometer schmalen Bereich in der Probe (siehe Abb. 2.6). Dabei wird das Hintergrundsignal im Vergleich zur Auflicht-Beleuchtung (EPI) immer noch stark reduziert, die HILO-Beleuchtung ist also sehr gut für die Betrachtung der Kernporenkomplexe an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns geeignet. Der Strahlengang in einer HILO-Beleuchtung entspricht dabei weitestgehend dem einer TIRF-Beleuchtung, allerdings wird der Einfallswinkel kleiner als der kritische Winkel gewählt und somit ein stark geneigter Strahl über dem Deckglas erzeugt.

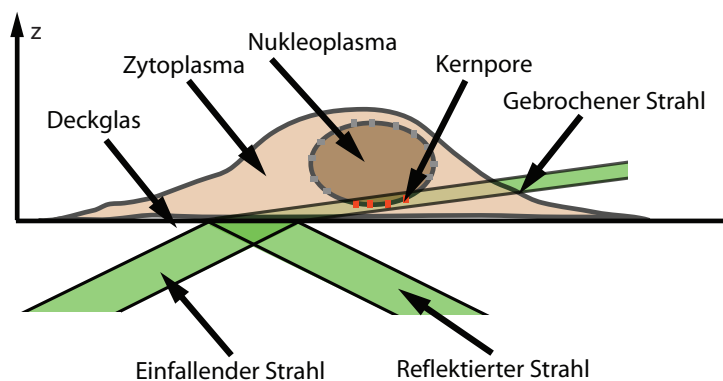


Abbildung 2.6: HILO Strahlengang durch Unterseite einer Zelle. Es werden nur die GFP in Kernporen an der Unterseite der Zelle angeregt.

Um auch Informationen über die Position der analysierten Kernporen bzw. Transportrezeptoren relativ zum Deckglas (also in Richtung der optischen Achse) zu erhalten, wurde zusätzlich eine schwach fokussierende Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang des Mikroskopaufbaus implementiert. Diese kodiert die z-Position in der PSF einer abgebildeten Kernpore bzw. eines Transportrezeptors. Da somit alle drei Raumkoordinaten eines Transportrezeptors aus den Bildern gewonnen werden können, lässt sich theoretisch der komplette Transportprozess durch den Kernporenkomplex nachvollziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine TIRF/HILO-Beleuchtung an einem inversen Lichtmikroskop realisiert und die Eigenschaften des HILO-Strahls genauer untersucht. Mit dem Aufbau wurden die dynamischen Eigenschaften verschiedener Transportrezeptoren während des Kern-Zytoplasma-Transports untersucht, sowohl im freien Zustand, als auch substratgebunden. Es

2.3 Übersicht über die Kapitel

wurde die Bindungsdauer an der Kernpore gemessen und die räumliche Verteilung der Transportrezeptoren an der Pore bestimmt.

2.3 Übersicht über die Kapitel

Im Grundlagenkapitel dieser Arbeit wird zunächst das Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskop beschrieben und die Besonderheiten der Fluoreszenzmikroskopie erläutert. Es werden die physikalischen und mathematischen Grundlagen der TIRF-Mikroskopie erklärt und die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes berechnet. Für die HILO-Beleuchtung wird der erwartete Durchmesser und die Divergenz des HILO-Strahls beschrieben und dessen Lage relativ zur Fokusebene erläutert.

Das Kapitel „Charakterisierung des Aufbaus“ beschreibt zunächst die Erweiterung des Aufbaus mit optischen Komponenten zu einem TIRF/HILO-Mikroskop. Es wird die Ausdehnung des HILO-Strahls vermessen sowie deren Veränderung unter Verwendung verschiedener Feldblenden und Wellenlängen. Die Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses im Vergleich zu einer EPI-Beleuchtung wird diskutiert. Die durch das Einbringen einer Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang erforderliche Kalibrierung zur Bestimmung der z-Position eines abgebildeten Partikels wird beschrieben und für die Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546 durchgeführt. Danach wird die Berechnung des axialen Abstands zweier Partikel erläutert sowie deren Fehler bestimmt. Zum Schluss wird die chromatische Aberration der Objektive in z-Richtung für die Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546 bestimmt.

Im Kapitel „Material und Methoden“ werden zunächst die biochemischen Methoden beschrieben. Die Zellkultur sowie die Präparation von Zellen und die Markierung der untersuchten Rezeptoren mit Farbstoffen wird erläutert. Anschließend wird die Durchführung der Experimente beschrieben, welche die Aufnahme von Bildstapeln von an die Kernpore bindenden Transportrezeptoren zum Ziel hat. Die Auswertung der erhaltenen Bildstapel wird mit den Softwarepaketen ImageJ und Matlab durchgeführt. Die verwendeten Selektionskriterien für Bindungsereignisse werden erläutert.

Im Ergebniskapitel werden die Resultate der Experimente beschrieben. Zunächst wird die Bestimmung der Bindungszeiten erklärt, sowie der Einfluss bestimmter Selektionsparameter auf diese diskutiert. Die Lokalisierungsgenauigkeiten in lateraler und axialer Richtung werden bestimmt. Abschließend werden die radialen und axialen Verteilungen der Bindungsstellen dargestellt.

Im Diskussionskapitel werden schließlich die im vorigen Kapitel erhaltenen Ergebnisse der Bindungszeiten und Bindungsstellen der unterschiedlichen Transportrezeptoren und Transportkomplexe diskutiert. Hierbei werden die erhaltenen Daten mit bisherigen Studien verglichen und eine Interpretation, auch im Bezug auf die existierenden Modelle für den Kern-Zytoplasma-Transport, durchgeführt. Abschließend folgt eine kurze Zusammenfassung und ein Ausblick, welcher mögli-

che Verbesserungen und weiterführende Experimente aufzeigt.

3 Grundlagen

3.1 Der Einzelmolekül-Mikroskop-Aufbau

Der verwendete Mikroskop-Aufbau zur Einzelmolekülmikroskopie besteht aus vier Komponenten: der Laserselektion, der Strahleinkopplung, dem Mikroskopkörper und der Detektionseinheit (Kamera).

Das Mikroskop ist ein Axiovert 200 (Carl Zeiss Jena GmbH). Dabei handelt es sich um ein inverses Mikroskop mit Komponenten zur Durchlichtbeleuchtung und zur Auflichtbeleuchtung (*EPI*, gr. für „auf“). Für die Durchlichtbeleuchtung wird eine Halogenlampe verwendet, deren Licht mittels einer Kondensoreinheit auf die Probe gelenkt wird. Für das klassische Auflichtverfahren wird eine HBO-Lampe (Quecksilberdampf Lampe) verwendet, welches Anregungslicht in Form ausgewählter Linien aus einem großen Wellenlängenbereich zur Verfügung stellt. Aus diesen Linien werden die benötigten Wellenlängen durch Anregungsfilter selektiert.

In dem in dieser Arbeit realisierten Aufbau wird anstelle der HBO-Lampe Laserlicht zur Beleuchtung der Proben verwendet. Dadurch werden sehr viel höhere Leistungsdichten einer bestimmten Wellenlänge erreicht, man ist jedoch durch die Anzahl der vorhandenen Laser in der Auswahl der Wellenlängenbereiche limitiert. In dem hier verwendeten Aufbau stehen zur Fluoreszenzanregung drei Wellenlängen zur Verfügung: 488nm, 532nm und 635nm.

Für die Realisierung der Laserbeleuchtung und später der TIRF- und HILO-Beleuchtung wurden die optischen Elemente zur Beleuchtung mittels HBO-Lampe aus dem Mikroskopkörper entfernt. Weiterhin wurde das Mikroskop um einen eigens hergestellten Objektisch erweitert, welcher zusätzlich zur Positionierung in der Ebene senkrecht zur optischen Achse (x/y-Richtung) auch das Verschieben der Probe in z-Richtung (parallel zur optischen Achse) ermöglicht. Dieser Objektisch besitzt spezielle Aussparungen für die in den Experimenten verwendeten MatTeck-Schalen.

Die Lasereinkopplung ist ein separater Bereich in dem drei Laserstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen in eine optische Faser (Lichtwellenleiter) eingekoppelt werden (siehe Abb. 3.1). Dazu werden die Strahlen zunächst mittels Spiegeln und Dichromaten zur Überlagerung gebracht und durch einen AOTF (*acousto optical tunable filter*) gelenkt. Durch Anlegen verschiedener Frequenzen und Amplituden im Radiowellenbereich lassen sich durch den AOTF bestimmte Wellenlängen und Intensitäten selektieren. Die selektierte Wellenlänge wird dann in die optische

Faser eingekoppelt, deren Ausgang den Beginn der Strahleinkopplung darstellt.

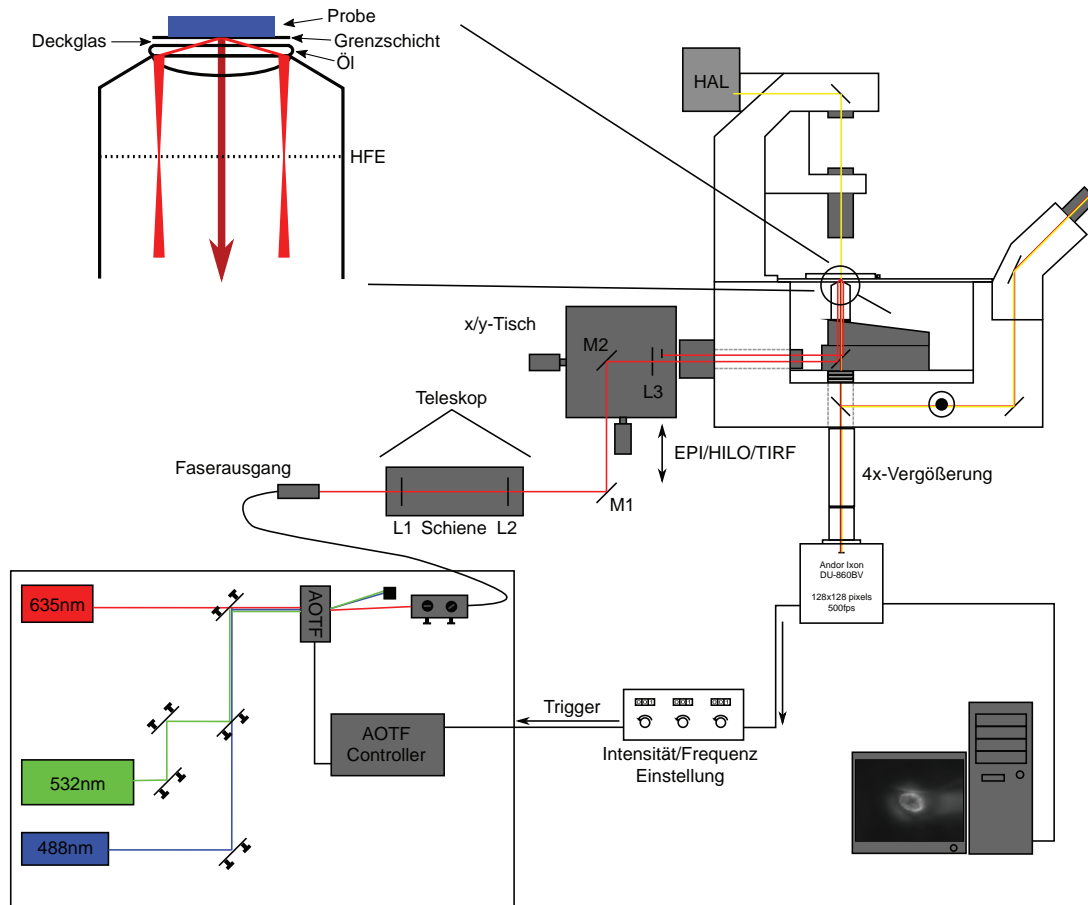


Abbildung 3.1: Skizze des Einzelmolekülaufbaus mit Lasereinkopplung und Strahlengang.

Die Strahleinkopplung verändert die räumliche Ausdehnung und Position des Laserstrahls bevor er in das Mikroskop eintritt. Zunächst wird der Strahl mittels zweier Spiegel entlang einer Schiene ausgerichtet. Auf dieser Schiene befindet sich ein Teleskop zur Strahlaufweitung in dessen Fokus zugleich eine Irisblende (Durchmesser $d=25\mu\text{m}$) zur räumlichen Filterung des Strahls eingebracht ist. Dies ist notwendig das Strahlprofil nach Verlassen der Faser vom ursprünglich gaußförmigen Profil abweicht. Durch den Raumfilter wird das Gaußprofil wieder hergestellt. Der aufgeweitete Strahl wird dann mittels Spiegeln so auf eine Sammellinse gelenkt, dass der Strahl in die hintere Fokusebene des Objektivs gebündelt wird und entlang der optischen Achse durch das Objektiv läuft.

Im Mikroskopkörper wird der Strahl zunächst durch einen Dichromaten um 90° abgelenkt und dann durch das Objektiv zur Probe geführt. Von der Probe reflektiertes oder gestreutes Licht (z.B. an den Grenzflächen zwischen Objektivlinse, Immersionsöl, Deckglas und Probe) trifft wieder auf den Dichromaten. Dieser ist so gewählt, dass er das Anregungslicht reflektiert, aber

3.2 Fluoreszenz

das von einer fluoreszierenden Probe emittierte rotverschobene Licht transmittiert. Dadurch wird bereits eine starke Abschwächung des detektierten Anregungslichts um ca. 80-90% erreicht. Da die verwendete Kamera aber sehr lichtempfindlich ist, und die verwendeten Fluorophore zumeist auch nur vergleichsweise wenige Photonen emittieren muss das verbleibende Anregungslicht weiter herausgefiltert werden. Dazu werden sog. *Notch*-Filter verwendet, welche eine optische Dichte von OD6 besitzen (entspricht einer Abschwächung von 10^{-6}). Für jede der drei verwendeten Wellenlängen kann ein passender *Notch*-Filter in den Detektionsstrahlengang eingefügt werden. Diese sitzen in speziellen Schiebern, welche je nach Bedarf ein- und ausgefahren werden können und liegen direkt unterhalb des Filterrevolvers und oberhalb der Tubuslinse.

Der Aufbau besitzt zwei EMCCD-Kameras (*Electron Multiplying Charge Coupled Device*), welche sich am *side*- bzw *base*-Port des Mikroskopkörpers befinden. Vor den Kameras befinden sich noch jeweils eine Vierfach-Vergrößerung, welche dazu dient die effektive Pixelgröße der Kameras zu verkleinern. Bei den Kameras handelt es sich um eine Ixon-DUV-897 und eine Ixon-DUV-860 (Andor Technology plc, Belfast, NIR). Die Ixon-DUV-897 besitzt einen Detektionsbereich von 512x512 Pixeln mit einer Pixelgröße von 16µm (effektive Pixelgröße 40nm, bei 400-facher Gesamtvergrößerung) und schafft bis zu 30Hz Aufnahmezeit für ein Vollbild. Die Ixon-DUV-860 besitzt einen Detektionsbereich von 128x128 Pixeln mit einer Pixelgröße von 24µm (effektive Pixelgröße 60nm, bei 400-facher Gesamtvergrößerung) und schafft bis zu 500Hz Aufnahmezeit für ein Vollbild. Erstere wird wegen ihres großen Bildfeldes zumeist für Übersichtsbilder oder zur Abbildung relativ langsamer Prozesse verwendet, während letztere unter anderem bei der Messung schneller Prozesse in Zellen zum Einsatz kommt.

3.2 Fluoreszenz

In der klassischen Durchlichtmikroskopie wird weißes Licht, welches sich aus allen sichtbaren Wellenlängen zusammensetzt durch eine zu betrachtende Probe geschickt und Abschwächungen in der Helligkeit detektiert. Diese machen dadurch Strukturen im Objekt sichtbar. Andere Kontrastmethoden wie z.B. Phasenkontrast oder Differenzieller Interferenz Kontrast (DIC) arbeiten ebenfalls mit weißem Licht, heben aber besonders Strukturen mit unterschiedlichen Brechungsindizes hervor. Die Fluoreszenzmikroskopie hat drei herausragende Eigenschaften: zum Einen werden nur bestimmte Teile oder Bereiche einer Probe mit fluoreszenten Molekülen markiert. Dadurch lassen sich z.B. in Zellen sehr selektiv Bereiche wie zum Beispiel der Zellkern oder auch einzelne Moleküle betrachten, ohne störende Informationen aus Bereichen die nicht von Interesse sind (im optimalen Fall). Zum Zweiten haben fluoreszente Moleküle die essentielle Eigenschaft, dass sie die absorbierte Energie einer bestimmten Anregungswellenlänge als Strahlung einer größeren Wellenlänge wieder emittieren. Dadurch ist es möglich das Anregungslicht durch einen

Dichromaten aus dem Detektionsstrahlengang zu filtern und das Fluoreszenzlicht mit möglichst wenig Hintergrundstrahlung abzubilden. Als Drittes werden die fluoreszenten Moleküle nur von bestimmten Anregungswellenlängen zum Leuchten angeregt, wodurch es möglich ist verschiedene Bereiche oder Strukturen in einer Zelle mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern zu markieren und dann nacheinander (oder gleichzeitig, mit geeigneten Dichromaten im Detektionsstrahlengang) abzubilden.

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

Im folgenden sollen zwei spezielle kontrastverstärkende Beleuchtungsmethoden in der Fluoreszenzmikroskopie beschrieben werden. Die TIRF-Mikroskopie macht sich die Eigenschaft zunutze, dass bei Totalreflexion einer einfallenden Welle ein Teil in Form einer evaneszenten Welle in die Probe eindringt und dort Fluoreszenz anregen kann. Durch die geringe Eindringtiefe wird nur ein sehr schmaler Bereich selektiv beleuchtet [Axel 84, Mash 03]. Die HILO-Beleuchtung nutzt einen stark gebrochenen Strahl um ebenfalls nur einen schmalen Bereich über dem Deckglas zu beleuchten. Die Eindringtiefe ist dabei deutlich größer als mit TIRF-Beleuchtung, wodurch Vorgänge tiefer im Inneren einer Probe abgebildet werden können. Beide Methoden eignen sich also besonders für Fluoreszenzuntersuchungen in der Nähe der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe.

3.3.1 Totale Interne Reflexion Fluoreszenzmikroskopie

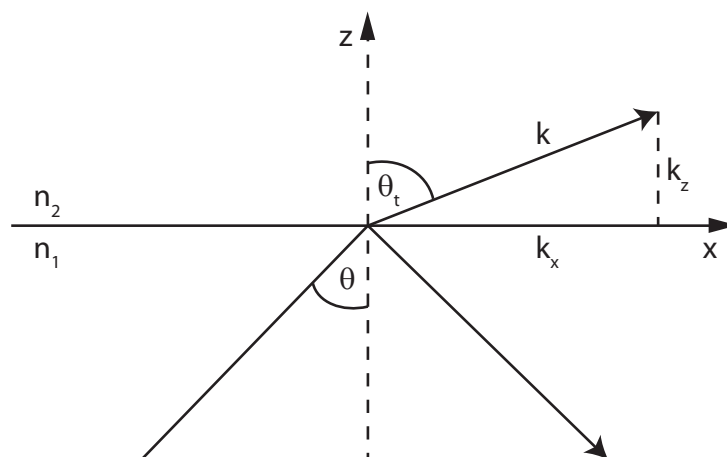


Abbildung 3.2: Brechung eines Lichtstrahls beim Übergang in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex $n_2 < n_1$.

Trifft eine ebene Welle unter einem Winkel auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen optischen Brechungsindizes n_i , wird sie gebrochen, d.h. um einen Winkel von

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

ihrer ursprünglichen Richtung abgelenkt. Geht zum Beispiel der Strahl von einem optisch dichteren Medium M1 in ein optisch weniger dichtes Medium M2 über ($n_1 > n_2$) wird der mit der Senkrechten zur Grenzfläche eingenommene Winkel größer (siehe Abb. 3.2). Die Gleichung für die ebene Welle lautet:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{A} \exp(i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)) \quad (3.1)$$

Hier ist A die Amplitude des elektrischen Feldes, $\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \vec{e}_k$ der Wellenzahlvektor in Richtung der Ausbreitungsrichtung \vec{e}_k , \vec{r} der Ortsvektor und ω die Kreisfrequenz. Im folgenden wird der Einfachheit halber nur das elektrische Feld einer Welle betrachtet. Das elektrische Feld lässt sich aufteilen in Anteile \vec{E}_p und \vec{E}_s die parallel bzw. senkrecht zur Einfallsebene stehen. Die Einfallsebene wird dabei vom Richtungsvektor der einfallenden Welle und der Normalen zur Grenzfläche aufgespannt.

Es gilt folgende Beziehung zwischen dem Einfallswinkel θ und dem Ausfallswinkel θ_t der transmittierten Welle (Snellius'sches Brechungsgesetz):

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{\sin(\theta_t)}{\sin(\theta)} \quad (3.2)$$

Wird nun der Einfallswinkel groß genug, erreicht der Ausfallswinkel $\theta_t = 90^\circ$ und die Welle wird an der Grenzfläche total reflektiert. Der dazu nötige Einfallswinkel wird als kritischer Winkel bezeichnet:

$$\theta_{krit} = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (3.3)$$

An der Grenzfläche tritt dabei im optisch dünneren Medium eine in z-Richtung exponentiell abklingende Welle auf, die sog. evaneszente Welle. Diese dringt nur um wenige hundert Nanometer (ca. eine halbe Wellenlänge des einfallenden Lichts, siehe Gl. 3.22) in das Medium ein. Dabei wird im zeitlichen Mittel keine Energie in das optisch dünnere Medium übertragen. Man kann die evaneszente Welle aber nachweisen, indem man z.B. an eine Glas-Luft Grenzfläche einen zweiten Glaskörper auf eine Distanz von ungefähr einer Wellenlänge annähert. Dadurch dringt Licht in diesen ein, welches sich dann (stark abgeschwächt im Vergleich zur Ausgangsintensität) weiter ausbreitet und nachgewiesen werden kann (*Frustrated Total Internal Reflection, FTIR*).

Bei der Untersuchung biologischer Proben befinden sich die markierten Moleküle in einer sehr geringen Entfernung von der Grenzschicht, z.B. innerhalb von Lipidmembranen welche eine Dicke

von wenigen nm besitzen. Die geringe Eindringtiefe ermöglicht also die selektive Anregung von Fluorophoren, welche sich sehr nahe ($\lesssim 100\text{nm}$) an der Grenzfläche befinden. Dadurch wird ein Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses in Bezug auf den Hintergrund erreicht.

Die typische Grenzschicht im Falle der Untersuchung von biologischen Proben ist Glas/Wasser (Zytoplasma hat einen Brechungsindex von ungefähr 1,35, Wasser einen von 1,33 bei Raumtemperatur). Setzt man die Werte der Brechungsindizes für Wasser ($n_2 = 1,33$) und Glas ($n_1 = 1,51$) in Gleichung 3.3 ein, erhält man für den kritischen Winkel $\theta_c = 61,74^\circ$. Dieser ist mit modernen Objektiven mit numerischen Aperturen ab $NA=1,45$ gut erreichbar.

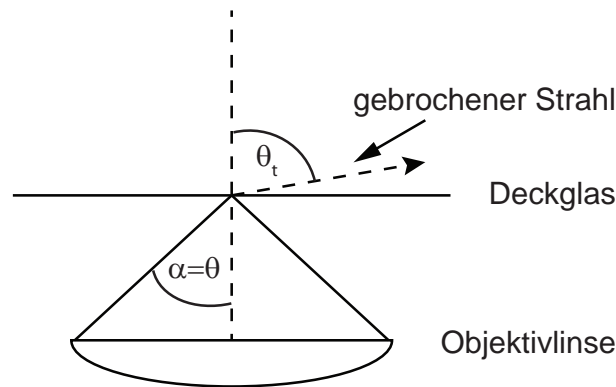


Abbildung 3.3: Zusammenhang zwischen dem Öffnungswinkel α der numerischen Apertur und dem Einfallswinkel θ .

Für die numerische Apertur gilt:

$$NA = n_1 \sin \alpha \quad (3.4)$$

Das Objektiv besitzt einen maximalen halben Öffnungswinkel α , welcher in Abb. 3.3 dem maximalen Einfallswinkel θ entspricht. Damit nun der Einfallswinkel θ immer größer dem kritischen Winkel θ_{krit} ist, muss nach Umformen von Gl.3.4 und Gleichsetzen mit Gl.3.3 gelten:

$$\sin^{-1} \left(\frac{NA}{n_1} \right) \geq \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (3.5)$$

$$\Rightarrow NA \geq n_2 \quad (3.6)$$

Das bedeutet, dass die numerische Apertur des Objektivs größer sein muss, als der Brechungsindex des Mediums, an dem Totalreflexion durchgeführt werden soll.

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

Fresnel'sche Formeln

Zur späteren Berechnung der Feldstärken an der Grenzfläche bei Totalreflexion werden hier kurz die Fresnel'schen Formeln eingeführt. Diese, sowie auch das Snellius'sche Brechungsgesetz, lassen sich aus Überlegungen zum Verhalten der Wellenvektoren \vec{k} beim Auftreffen von ebenen Wellen auf eine Grenzfläche herleiten [Born 97, Hech 01]. Sie beschreiben das Verhältnis der Amplituden von einfallender und transmittierter Welle, für die jeweiligen Anteile der Amplituden parallel zur Einfallsebene A_p und senkrecht dazu A_s (siehe Abb. 3.4 für die parallelen Anteile, die senkrechten Anteile befinden sich senkrecht zur Zeichenebene und sind, ebenso wie die Anteile der reflektierten Welle, nicht dargestellt). Es gilt für die Transmissions- bzw. Reflexionskoeffizienten τ bzw. ρ für parallele bzw. senkrechte Anteile der Amplitude, mit $n = \frac{n_2}{n_1}$:

$$\tau_p = \frac{A_{tp}}{A_p} = \frac{2n_1 \cos \theta}{n_2 \cos \theta + n_1 \cos \theta_t} \quad (3.7)$$

$$= \frac{2 \cos \theta}{n \cos \theta + \cos \theta_t} \quad (3.8)$$

$$\tau_s = \frac{A_{ts}}{A_s} = \frac{2n_1 \cos \theta}{n_1 \cos \theta + n_2 \cos \theta_t} \quad (3.9)$$

$$= \frac{2 \cos \theta}{\cos \theta + n \cos \theta_t} \quad (3.10)$$

$$\rho_p = \frac{A_{rp}}{A_p} = \frac{n_2 \cos \theta - n_1 \cos \theta_t}{n_2 \cos \theta + n_1 \cos \theta_t} \quad (3.11)$$

$$= \frac{n \cos \theta - \cos \theta_t}{n \cos \theta + \cos \theta_t} = \frac{\tan(\theta - \theta_t)}{\tan(\theta + \theta_t)} \quad (3.12)$$

$$\rho_s = \frac{A_{rs}}{A_s} = \frac{n_1 \cos \theta - n_2 \cos \theta_t}{n_1 \cos \theta + n_2 \cos \theta_t} \quad (3.13)$$

$$= \frac{\cos \theta - n \cos \theta_t}{\cos \theta + n \cos \theta_t} = -\frac{\sin(\theta - \theta_t)}{\sin(\theta + \theta_t)} \quad (3.14)$$

Hier bezeichnen A_{tp} und A_{ts} die Amplituden der transmittierten Welle, A_p und A_s die Amplituden der einfallenden Welle, A_{rp} und A_{rs} die Amplituden der reflektierten Welle, θ den Einfallswinkel und θ_t den Austrittswinkel.

Eigenschaften der transmittierten Welle für $\theta > \theta_c$

Für das elektrische Feld der transmittierten Welle gilt (siehe Gl.3.1 und Abb. 3.2):

$$\vec{E}_t = \vec{A}_t \exp(i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)) \quad (3.15)$$

$$= \vec{A}_t \exp(i(k(x \sin \theta_t + z \cos \theta_t) - \omega t)) \quad (3.16)$$

$$= \vec{A}_t \exp(i(kx \sin \theta_t - \omega t)) \exp(ikz \cos \theta_t) \quad (3.17)$$

Es gilt $k = \frac{2\pi}{\lambda}$. In diesem Fall ist nur die x- und z-Richtung der Wellenzahl k von Bedeutung (siehe Abb. 3.2). Wendet man die Identität $\sin^2 + \cos^2 = 1$ auf den Term $\cos \theta_t$ an und außerdem das Snellius'sche Brechungsgesetz Gl.3.2 erhält man (mit $n = \frac{n_2}{n_1}$):

$$\cos \theta_t = \sqrt{1 - \sin^2 \theta_t} \quad (3.18)$$

$$= \pm i \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{n^2} - 1} \quad (3.19)$$

Da für $\theta > \theta_c$ der Term unter der Wurzel negativ wird, zieht man den Imaginärteil vor die Wurzel. Ersetzt man nun ebenfalls den Term $\sin \theta_t$ mit $\frac{\sin \theta}{n}$ (Gl.3.2) erhält man:

$$\vec{E}_t = A_t \exp\left(i\left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t\right)\right) \exp\left(\mp kz \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{n^2} - 1}\right) \quad (3.20)$$

In dieser Gleichung für das elektrische Feld der transmittierten Welle erkennt man, dass die Welle sich entlang der Grenzfläche in x-Richtung ausbreitet und in z-Richtung exponentiell abfällt. Das positive Vorzeichen vor der Wurzel ergibt keine physikalisch sinnvolle Lösung und wird daher nicht weiter betrachtet.

Berechnet man nun die Intensität der transmittierten Welle ergibt sich:

$$I_t = |E_t|^2 = |A_t|^2 \exp\left(-2kz \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{n^2} - 1}\right) \quad (3.21)$$

Man kann nun die sogenannte Eindringtiefe der evaneszenten Welle in das optisch dünnere Medium bestimmen. Diese ist definiert als der Abstand an dem die Ausgangsintensität auf den 1/e-ten Teil abgefallen ist. Sie ergibt sich aus Gl.3.21 zu:

$$d = \frac{\lambda_2}{4\pi \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{n^2} - 1}} = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (3.22)$$

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

Hier beschreibt λ_2 die Wellenlänge im optisch dünneren Medium und $\lambda = n_2 \lambda_2$ die Wellenlänge im optisch dichteren Medium. Die Eindringtiefe ist also abhängig vom Einfallswinkel, den Brechungsindizes der beiden optischen Medien und der Wellenlänge des einfallenden Lichts. So gilt z.B. für den Übergang von Glas ($n=1,51$) zu Wasser ($n=1,33$) unter einem Einfallswinkel von 70° und die Wellenlänge 633nm für die Eindringtiefe $d=136\text{nm}$.

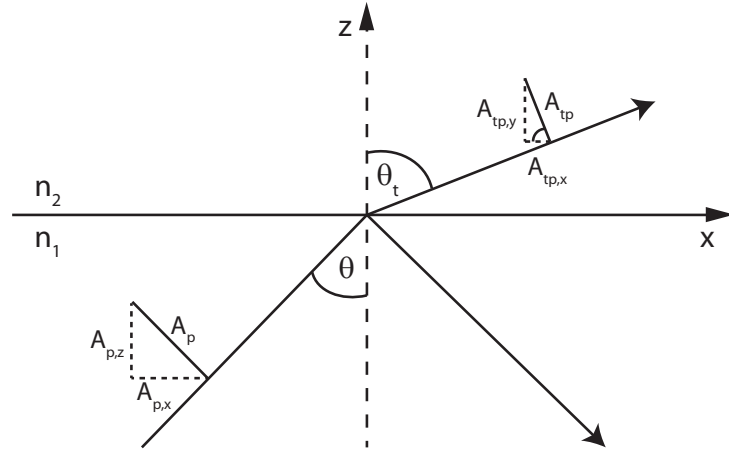


Abbildung 3.4: Amplituden des elektrischen Feldes parallel zur Einfallsebene.

Wir betrachten nun die Größen des Elektrischen Feldes und der Intensität in den drei Raumrichtungen in der Ebene der Grenzfläche, d.h. $z=0$. Es gilt für die Anteile in x/y/z-Richtung der transmittierten parallelen Amplitude A_{tp} bzw. senkrechten Amplitude A_{ts} (siehe Abb. 3.4):

$$A_{tp,x} = A_{tp} \times (-\cos \theta_t) \quad (3.23)$$

$$A_{ts,y} = A_{ts} \quad (3.24)$$

$$A_{tp,z} = A_{tp} \times \sin \theta_t \quad (3.25)$$

Dann folgt mit 3.20 und den Fresnelschen Gleichungen 3.9 und 3.10 für die elektrischen Feldstärken an $z=0$:

$$E_{t,x} = A_{tp} \times (-\cos \theta_t) \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.26)$$

$$= A_{ep} \times \frac{2 \cos \theta}{n \cos \theta + \cos \theta_t} \times (-\cos \theta_t) \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.27)$$

$$E_{t,y} = A_{ts} \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.28)$$

$$= A_{es} \times \frac{2 \cos \theta}{\cos \theta + n \cos \theta_t} \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.29)$$

$$E_{t,z=0} = A_{tp} \times \sin \theta_t \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.30)$$

$$= A_{ep} \times \frac{2 \cos \theta}{n \cos \theta + \cos \theta_t} \times \sin \theta_t \times \exp \left(i \left(kx \frac{\sin \theta}{n} - \omega t \right) \right) \quad (3.31)$$

Die Intensitäten berechnen sich nun proportional aus den Betragsquadraten der elektrischen Feldstärken, weshalb die Exponentialterme wegfallen. Weiterhin muss unterschieden werden zwischen den Fällen $\theta < \theta_{krit}$ und $\theta \geq \theta_{krit}$. Im zweiten Fall muss mit dem komplex konjugierten der elektrischen Feldstärke gerechnet werden, da $\cos \theta_t = i \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{n^2} - 1}$ wird. Es ergibt sich für den Fall $\theta < \theta_{krit}$:

$$I_{t,x} = |A_{ep}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta \cos^2 \theta_t}{(n \cos \theta + \cos \theta_t)^2} \quad (3.32)$$

$$I_{t,y} = |A_{es}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta}{(\cos \theta + n \cos \theta_t)^2} \quad (3.33)$$

$$I_{t,z} = |A_{ep}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta \sin^2 \theta_t}{(n \cos \theta + \cos \theta_t)^2} \quad (3.34)$$

Und für den Fall $\theta \geq \theta_{krit}$ ([Axel 84, Waza 05]):

$$I_{t,x} = |A_{ep}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta (\sin^2 \theta - n^2)}{n^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n^2} \quad (3.35)$$

$$I_{t,y} = |A_{es}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta}{1 - n^2} \quad (3.36)$$

$$I_{t,z} = |A_{ep}|^2 \times \frac{4 \cos^2 \theta \sin^2 \theta}{n^4 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n^2} \quad (3.37)$$

In Abb. 3.5 sind die verschiedenen Anteile der Intensitäten gegen den Einfallswinkel aufgetragen, wobei I_p die Summe der parallelen Anteile, also von $I_{t,x}$ und $I_{t,z}$ ist. Man erkennt, dass die Intensität der evaneszenten Wellen im Bereich eines Bruchteils der Wellenlänge von der Grenzflä-

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

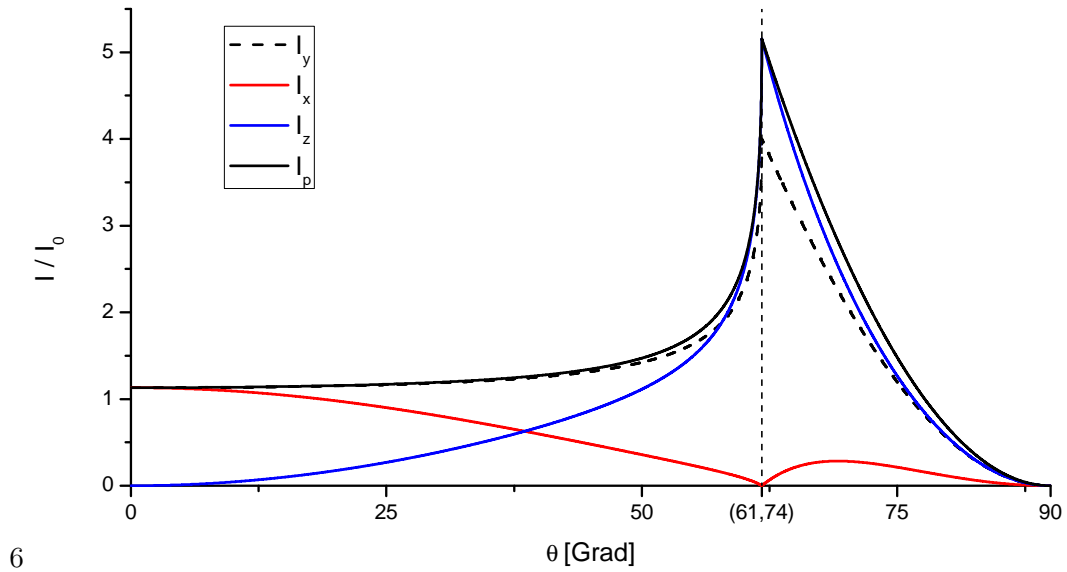


Abbildung 3.5: Intensitäten der parallelen und senkrechten Anteile der evaneszenten Welle an der Grenzfläche in Abhängigkeit des Einfallswinkels. Die Intensitätswerte sind im Verhältnis zur Einfallintensität dargestellt. Beim kritischen Winkel $\theta = 61,74^\circ$ erreicht die transmittierte Intensität das vier- bis fünffache der Einfallintensität.

che ein vielfaches der einfallenden Intensität betragen kann. Dies zeigt sich im z.B. Experiment durch einen starken Anstieg der detektierten Helligkeit von Fluorophoren, wenn man sich dem kritischen Winkel nähert.

Weiterhin sieht man in Abb. 3.5, dass die sich entlang der Grenzfläche ausbreitende Welle einen longitudinalen Anteil der elektrischen Feldstärke in Ausbreitungsrichtung x besitzt. Der Anteil in z -Richtung ist deutlich größer für Einfallswinkel nahe θ_{krit} wodurch sich eine elliptisch polarisierte Welle ergibt (siehe [Axel 01, Axel 03]).

Die dementsprechend stark selektive Anregung von Molekülen mit Dipolmomenten, welche entlang der z -Achse ausgerichtet sind, kann man im Experiment beobachten. Fluorophore, deren Dipolachse in z ausgerichtet ist, emittieren Strahlung entlang eines Kegels in Richtung des Mediums mit dem größeren Brechungsindex, wodurch das Bild eines solchen Fluorophors nicht mehr punktförmig ist, sondern die Form eines Rings annimmt („Donut“-Form) (siehe [Mert 00, Topr 06]).

3.3.2 Highly Inclined Laminated Optical Sheet Mikroskopie

In der HILO-Mikroskopie ist der Strahlengang mit dem in der TIRF-Mikroskopie sehr ähnlich. Allerdings wird der einfallende Strahl nicht zur Totalreflexion an der Grenzschicht zwischen Deckglas und Probe gebracht, sondern unter einem sehr großen Winkel (aber $<90^\circ$) gebrochen [Toku 08, Kono 08]. Das bedeutet, dass der Beleuchtungsstrahl anders als bei der EPI-Beleuchtung nicht den gesamten Raum oberhalb der Grenzfläche durchläuft, sondern nur ei-

nen schmalen Bereich, welcher vom Brechungswinkel abhängt (siehe Abb. 3.6). Dadurch wird ähnlich wie bei der TIRF-Mikroskopie eine Anregung von Fluorophoren, die sich oberhalb der Ausdehnung des gebrochenen Strahls befinden, verhindert und somit die Hintergrundintensität verringert. Allerdings ist der illuminierte Bereich bei der HILO-Beleuchtung variabel einstellbar, wohingegen die Eindringtiefe der evaneszenten Welle nur in einem sehr kleinen Bereich, abhängig von Wellenlänge und Einfallswinkel, variiert werden kann. Die HILO-Beleuchtung ist deshalb besonders gut für die Betrachtung der Kernporen lebender Zellen geeignet, da sich diese (bei einer adhären Zelle) oberhalb der Eindringtiefe der evaneszenten Welle befinden. In Abb. 3.6 ist der Unterschied zwischen klassischer EPI-Beleuchtung und der HILO-Beleuchtung dargestellt.

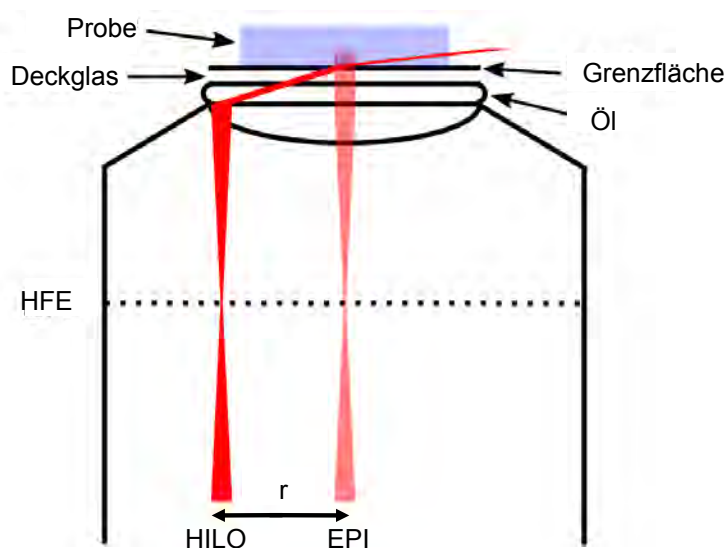


Abbildung 3.6: EPI/HILO Strahlengang durch das Objektiv.

Strahlabstand zur optischen Achse

Nach der Abbe'schen Sinusbedingung für die Abbildung durch das Objektiv gilt (vgl. [Hoff 08]): $r = f \times NA$, hierbei ist r der Abstand des Strahls zur optischen Achse, f die Brennweite des Objektivs und NA die numerische Apertur, $NA = n_2 \sin(\theta)$. Für den kritischen Einfallswinkel θ_c der zur Totalreflexion des Strahls führt gilt: $\theta_c = \sin^{-1}(\frac{n_1}{n_2})$. Daraus folgt für den Abstand r_c bei Totalreflexion: $r_c = n_1 f$. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit Zellen kann als Brechungsindex der für eine wässrige Lösung angenommen werden, d.h. $n_1 = 1,33$. Die Brennweite des verwendeten 100x Objektivs (100x, $NA=1,45$, Alpha Fluor, Zeiss) berechnet sich aus der bekannten Brennweite der Tubuslinse von $f_{TL} = 164,5\text{mm}$ und der Vergrößerung $M = 100$ zu $f = \frac{f_{TL}}{M} = 1,645\text{mm}$. Daraus ergibt sich dann $r_c = 1,33 \times 1,645\text{mm} = 2,18\text{mm}$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem gemessenen Verschiebeweg des X/Y-Tisches um ca. 2mm

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

(abhängig von der betrachteten Probe) bis zum Eintritt der Totalreflexion überein. Für HILO-Beleuchtung wird der Strahl dementsprechend auf einen geringeren Abstand von der optischen Achse eingestellt.

Berechnung des Strahldurchmessers

Der Durchmesser des gebrochenen Lichtstrahls der HILO-Beleuchtung lässt sich näherungsweise (ohne Berücksichtigung der Divergenz) durch geometrische Optik berechnen (vgl. [Toku 08]). Es gilt für den Durchmesser dz des Strahls entlang der z -Richtung:

$$dz = \frac{R}{\tan(\theta_t)} \quad (3.38)$$

Hier ist R der Durchmesser des Strahls am Auftreffpunkt auf der Grenzfläche und θ_t der Austrittswinkel (siehe Abb. 3.7). In den durchgeführten Messungen des Strahldurchmessers ergab sich z.B. für einen Wert von $R=18\mu\text{m}$ und einem Winkel $\theta_t=78,9^\circ$ ein Durchmesser (genauer: Halbwertsbreite, FWHM) von $dz=3,1\mu\text{m}$ (theo. $dz=3,5\mu\text{m}$) (vgl. Abschnitt 4.2.2 auf Seite 33).

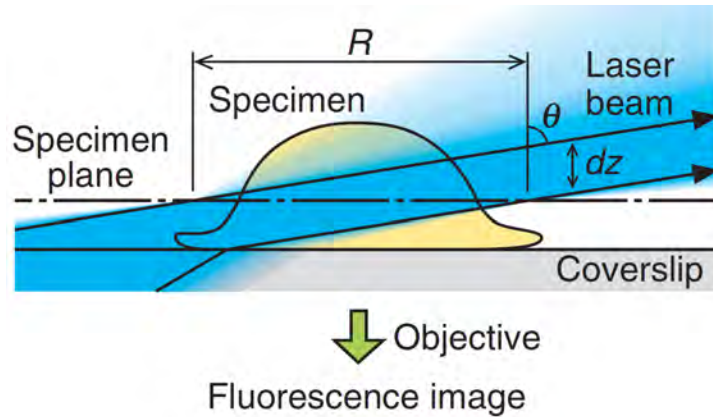


Abbildung 3.7: Ausdehnung des HILO-Strahls, übernommen aus [Toku 08].

Divergenz des Gaußstrahls

Als Radius des Gaußstrahls wird die Distanz senkrecht zur Ausbreitungsrichtung z des Strahls bezeichnet, an der die Intensität auf den $1/e^2$ -ten Teil abgefallen ist (siehe Abb. 3.8). Für den Radius w eines Gauß-Strahls in Abhängigkeit der Distanz z zur Strahltaile gilt:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \quad (3.39)$$

Hier ist w_0 der Radius des Strahls an seiner schmalsten Stelle und z_0 die Rayleighlänge, welche die Distanz zur Strahltaile bezeichnet an der der Radius $\sqrt{2}w_0$ beträgt. Die Größe $2w_0$ wird als Brennfleck (*spot size*) bezeichnet.

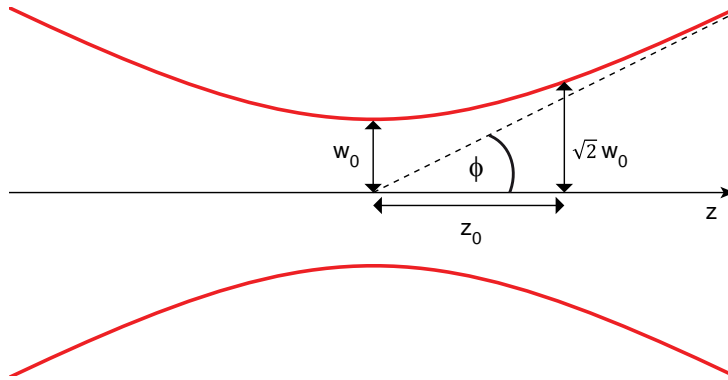


Abbildung 3.8: Skizze eines Gaußstrahls.

Für den Fall $z \gg z_0$ kann der erste Term unter der Wurzel in Gl.3.39 vernachlässigt werden und es gilt:

$$w(z) = \frac{w_0}{z_0} z = z \tan \phi \quad (3.40)$$

Wobei ϕ den Winkel zwischen dem Vektor der Ausbreitungsrichtung und der Asymptote an die Funktion $w(z)$ bezeichnet. Das bedeutet also, dass der Strahlradius (und somit auch der Durchmesser) linear mit dem Abstand zur Strahltaile zunimmt. In den Messungen zum Strahldurchmesser bei HILO-Beleuchtung konnte dies bestätigt werden (vgl. Abschnitt 4.2.2 auf Seite 35).

HILO-Strahlengang durch Fokusebene

Für die Anwendbarkeit der HILO-Beleuchtung ist es wichtig, dass der gebrochene Strahl immer durch die Fokusebene des Objektivs geht. Dies ist in den Abb. 3.9a und 3.9b dargestellt. In Abb. 3.9a befindet sich die vordere Fokusebene (VFE) genau auf oberen Kante des Deckglases (DG), es wird also auf die Oberkante des Deckglases fokussiert. In dieser Einstellung wird auch die Justage der HILO-Beleuchtung vorgenommen.

3.3 Spezielle Beleuchtungsmethoden

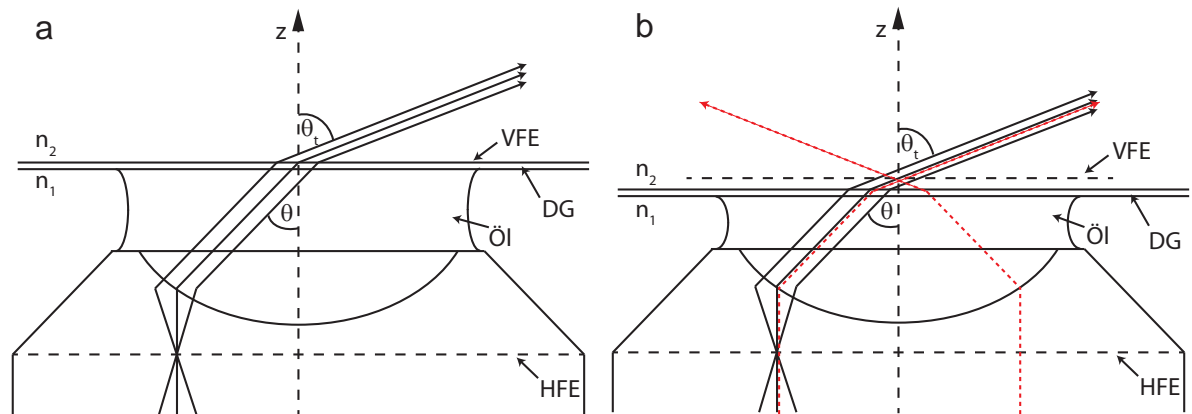


Abbildung 3.9: Hilo Strahlengang durch die vordere Fokusebene (VFE). (a) Das Objektiv ist auf die Oberseite des Deckglases (DG) fokussiert, hier liegt auch die VFE. (b) das Objektiv ist auf einen Punkt oberhalb des Deckglases fokussiert, rot gestrichelt: Fokussierung eines kollimierten Strahls. HFE: hintere Fokusebene

Bewegt man nun das Objektiv näher an das Deckglas heran (Abb. 3.9b), um einen Bereich im Inneren einer Probe zu fokussieren, trifft der gebrochene Strahl an einer verschobenen Position auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe. Der Mittelpunkt des gebrochenen Strahls durchläuft aber weiterhin genau den Schnittpunkt zwischen optischer Achse und vorderer Fokusebene. Dies lässt sich klarmachen, indem man sich einen kollimierten Strahl vorstellt, welcher auf die hintere Fokusebene trifft (siehe Abb. 3.9b, gestrichelte rote Linien, leicht versetzt für bessere Darstellbarkeit). Dieser wird durch das Objektiv in die vordere Fokusebene fokussiert. Der Mittelpunkt des HILO-Strahls entspricht dabei dem Rand des kollimierten Strahls. In den Zeichnungen wurde die Divergenz des gebrochenen Strahls nicht berücksichtigt. Diese bewirkt eine Zunahme des Durchmessers des Strahls an der Position der vorderen Fokusebene. Der Durchmesser wird größer, je weiter man in die Probe hineinfokussiert.

4 Charakterisierung des Aufbaus

In diesem Kapitel wird die Erweiterung eines bestehenden Einzel-Molekül-Aufbaus um eine TIRF- und HILO-Beleuchtung beschrieben. Anschließend werden die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SRV) unter HILO-Beleuchtung und die Dimensionen des sog. HILO - Strahls diskutiert. Danach wird die Einbringung einer schwach fokussierenden Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang diskutiert und die Kalibration der dadurch erhaltenen Informationen zur z-Position eines abgebildeten Partikels beschrieben. Abschließend wird die axiale chromatische Aberration des Aufbaus bestimmt.

4.1 Erweiterung des Einzelmolekül-Aufbaus um eine TIRF/HILO Beleuchtung

Zur Erweiterung des Aufbaus um eine TIRF- bzw. HILO-Beleuchtung wurden zunächst die optischen Elemente, welche zur Beleuchtung mittels einer HBO-Lampe dienen, entfernt, so dass sich im Mikroskopkörper nur noch Objektiv, Dichromat, (Abbildungs-)Tubuslinse und die Notchfilter befinden. Der aus der Faser kommende Laserstrahl wird über zwei Spiegel (nicht eingezeichnet) auf eine Gerade parallel zur optischen Schiene gelenkt (siehe Abb. 4.1). Auf der Schiene befinden sich zwei fokussierende Linsen L1 und L2 mit den Brennweiten $f_1 = 25\text{mm}$ und $f_2 = 200\text{mm}$ durch welche der Strahl um das 8-fache aufgeweitet wird.

Im Fokuspunkt dieses Teleskops befindet sich eine Lochblende (*Pinhole*, PH) mit einem Durchmesser von $25\mu\text{m}$, welche als Raumfilter dient. Dadurch erhält der Strahl wieder ein gaußförmiges Profil, welches durch den Durchgang durch AOTF und Faser gestört wurde. Der optimale Durchmesser (vgl. [Newp 13]) der Lochblende berechnet sich zu $D = \frac{f\lambda}{r} \approx 23\mu\text{m}$ für die Brennweite der Linse L1 $f=25\text{mm}$, dem 1/e-Durchmesser des Strahls vor der Linse L1 von $r=0,7\text{mm}$ und einer Wellenlänge von $\lambda=550\text{nm}$. Hierdurch werden Raumfrequenzen, die kleiner sind als der doppelte Durchmesser des Gaußstrahls geblockt, und trotzdem ca. 99% der Ursprungsintensität durchgelassen.

Nach der Strahlaufweitung wird der Strahl mittels zweier Spiegel M1 und M2 in den Mikroskopkörper gelenkt. Hinter M2 befindet sich noch eine weitere Linse L3, welche den kollimierten Strahl in die hintere Fokusebene (HFE) des Objektivs fokussiert. Der Spiegel M2 und die Linse

L3 befinden sich dabei auf einem verschiebbaren x-y-Tisch, wodurch der Laserstrahl senkrecht zur optischen Achse verschoben werden kann. Durch diese Verschiebung wird der Austrittswinkel des Laserstrahls aus dem Objektiv verändert, und somit zwischen EPI-, HILO- und TIRF-Beleuchtung gewechselt.

Die verwendeten Linsen L1, L2 und L3 sind achromatisch, wodurch der Aufbau für alle drei vorhandenen Laserlinien (488nm, 532nm, 635nm) verwendet werden kann. Zur Begrenzung des beleuchteten Bereichs in der Probe befindet sich eine verstellbare Irisblende auf der optischen Schiene und damit in einer zur Probe konjugierten Ebene.

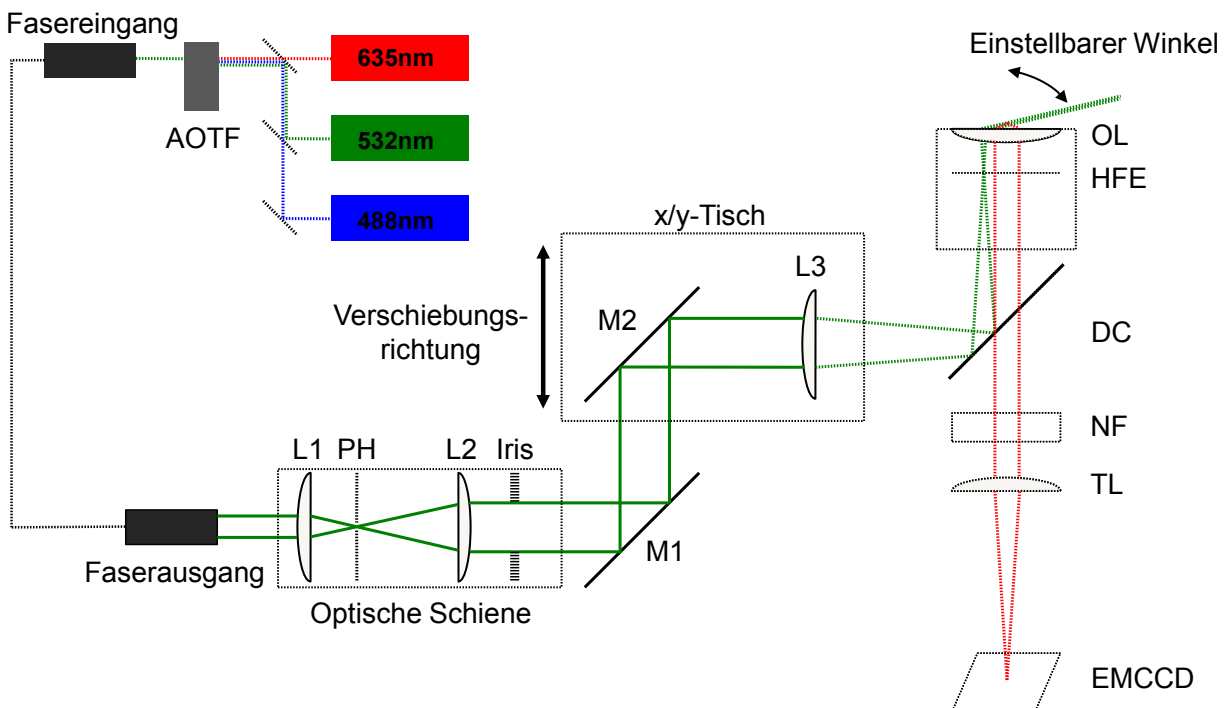


Abbildung 4.1: Skizze des Strahlengangs im HILO-Aufbau. L1,L2,L3: achromatische Duplettlinen, M1,M2: Spiegel, PH: Lochblende, Iris: verstellbare Irisblende, HFE: Hintere Fokusebene, OL: Objektivlinse, DC: Dichromat, NF: Notchfilter, TL: Tubuslinse, EMCCD: Kamera, *grün*: Anregungslicht, *rot*: emittiertes Licht eines Fluorophors.

4.2 Charakterisierung der HILO-Beleuchtung

Als HILO-Beleuchtung wird der Bereich bezeichnet, in dem der Austrittswinkel des Laserstrahls aus der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe (vgl. Abb. 3.9) deutlich größer als 0° und kleiner als 90° ist, d.h. also noch nicht total reflektiert wird. In der Praxis hat sich ein Winkel um 80° für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erwiesen. Im folgenden soll kurz die Verbesserung des SRV im Vergleich zur EPI-

4.2 Charakterisierung der HILO-Beleuchtung

Beleuchtung und die Dimensionen des gebrochenen Laserstrahls (HILO-Strahl) erläutert werden.

4.2.1 Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses

Dadurch, dass der HILO-Strahl nur einen dünnen Ausschnitt nahe des Deckglases beleuchtet, werden auch nur in diesem Bereich Fluorophore angeregt. Es wird also verhindert, dass Fluorophore außerhalb des Fokus zum Hintergrundsignal beitragen. Dadurch wird das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert. In Abb. 4.2 sind die GFP-markierten Kernporen einer HeLa-Zelle mit EPI- bzw. HILO-Beleuchtung abgebildet. Unter den Abbildungen sind jeweils die mittleren Intensitätsverläufe entlang des rot umrandeten Bereichs dargestellt. Diese sind nicht normiert, um zugleich auch die größere Signalintensität (bei gleicher Laserleistung des Anregungslichts) unter HILO-Beleuchtung deutlich zu machen.

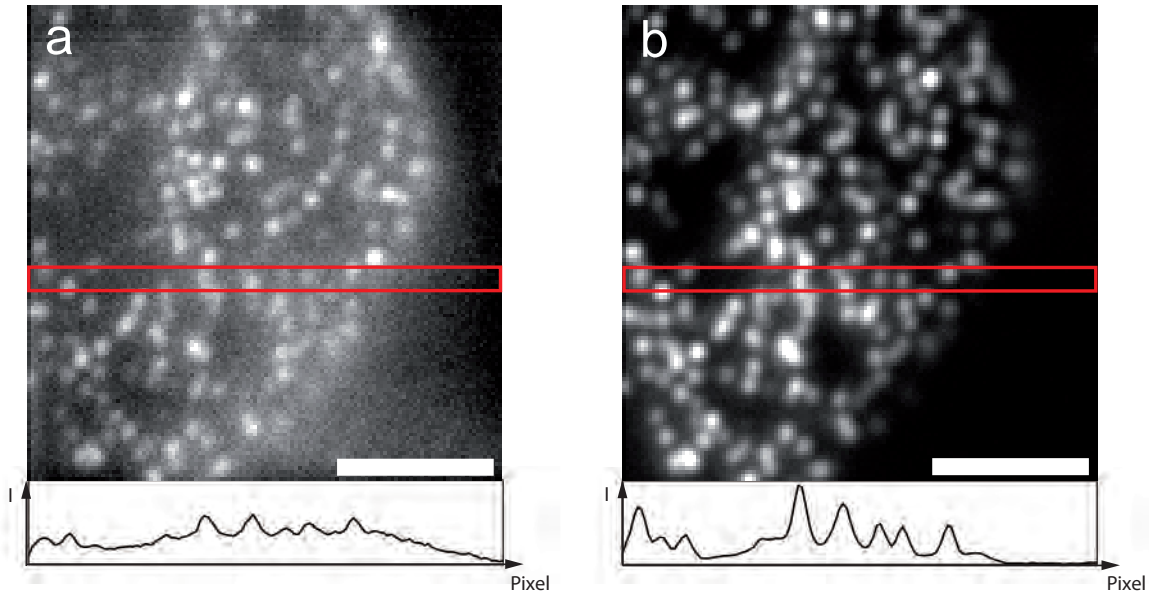


Abbildung 4.2: Abbildung der mit GFP markierten Kernporen einer HeLa-Zelle. Unten ist der mittlere Intensitätsverlauf entlang des in rot markiertem Bereichs für (a) EPI- (b) HILO-Beleuchtung gezeigt. Balken = 5µm.

Zur Quantifizierung der Verbesserung des SRV wurden markierte Mikropartikel in einer hohen Konzentration (zur Erzeugung eines hohen Hintergrundsignals) in einem 1%-Agarosegel immobilisiert und dann abgebildet. Zur Berechnung des SRV wurde von 10 Mikropartikeln das Verhältnis von Signalintensität und der Standardabweichung des Hintergrundsignals bestimmt und der Mittelwert gebildet.

Für EPI- und HILO-Beleuchtung unter einem Austrittswinkel von 80° und einem Durchmesser der Irisblende (s.o.) von $d=0,8\text{cm}$ wurde ein SRV von 23 ± 4 bzw. 50 ± 6 ermittelt (siehe Abb.

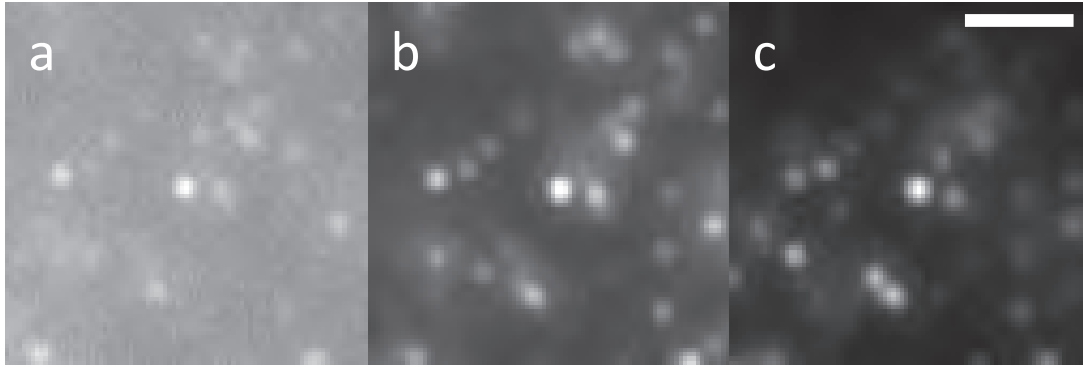


Abbildung 4.3: Abbildungen von immobilisierten markierten Mikropartikeln: (a) unter EPI-Beleuchtung, (b) unter HILO-Beleuchtung, Durchmesser der Irisblende $d=0,8\text{cm}$, (c) unter HILO-Beleuchtung mit $d=0,25\text{cm}$. Balken = $2\mu\text{m}$.

4.3 (a) und (b)). Verkleinert man die Öffnung der Irisblende, verkleinert man damit auch die Breite des HILO-Strahls. Dadurch lässt sich das SRV weiter verbessern. Für eine Öffnung der Irisblende von $d=0,25\text{cm}$ wurde ein SRV von 77 ± 8 gemessen (siehe Abb. 4.3 (c)). Hier wurden also Verbesserungen des SRV um das zwei- bzw. dreifache im Vergleich zur EPI-Beleuchtung erreicht.

4.2.2 Ausdehnung des HILO-Strahls

Als HILO-Strahl wird der gebrochene Laserstrahl bezeichnet, welcher aus dem Objektiv austritt (siehe Abb. 4.4). Durch den von 0° verschiedenen Austrittswinkel θ_t besitzt der HILO-Strahl in Richtung der optischen Achse (z-Richtung) einen endlichen Durchmesser (genauer: Halbwertsbreite, FWHM). In diesem Abschnitt wird dieser Durchmesser für einen Austrittswinkel von $\theta_t=80^\circ$ und für verschiedene Wellenlängen des Laserlichts bestimmt. Weiterhin wird der Einfluss unterschiedlicher Feldblenden (an der Position der Irisblende, vgl. 4.1) auf den Durchmesser untersucht, sowie die Auswirkung unterschiedlicher Abstände zwischen Objektiv und Deckglas.

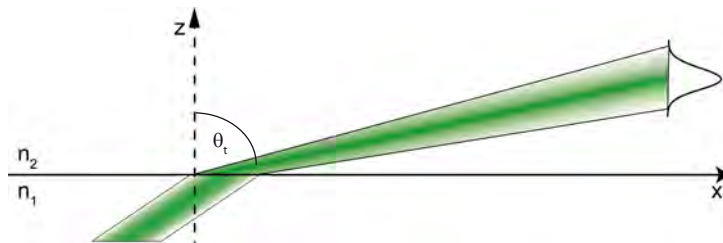


Abbildung 4.4: Darstellung des HILO-Strahls mit gausssförmigem Profil und Divergenz.

4.2 Charakterisierung der HILO-Beleuchtung

Knife-Edge-Methode

Die Bestimmung des Durchmessers der HILO-Strahls wurde mit der sogenannten *Knife-Edge*-Methode durchgeführt [Khos 83]. Dabei wird eine scharfe Kante (hier die einer Rasierklinge) entlang der z-Richtung durch den HILO-Strahl geführt und für verschiedene z-Positionen der Rasierklingenkante die Intensität des teilweise abgedeckten HILO-Strahls gemessen.

Hierfür wurde eine spezielle Probenhalterung mit einer seitlichen Öffnung konstruiert, welche es ermöglicht, die Intensität des HILO-Strahls ungehindert zu detektieren (siehe Abb. 4.5a). Dadurch wird die Verwendung einer Photodiode zur Detektion der HILO-Strahls in einem größeren Abstand zur Probe ermöglicht. Weiterhin wurde eine Halterung für die Rasierklinge konstruiert, welcher an einem Schrittmotor, der in z-Richtung verfährt, befestigt wurde. Der verwendete Schrittmotor (PI Physik Instrumente) hat eine minimale Schrittweite von 100nm. Die Kombination aus Halter und Schrittmotor ist zusätzlich in der Ebene senkrecht zur z-Richtung (x/y-Ebene) mit Mikrometerschrauben verfahrbar.

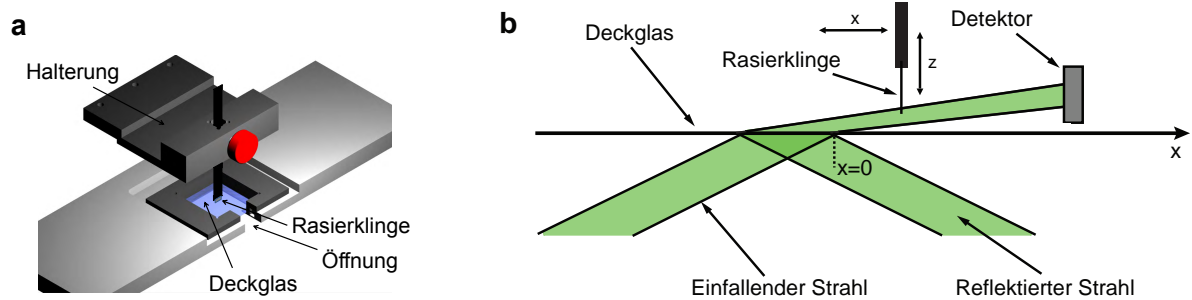


Abbildung 4.5: Skizzierung der Knife-Edge-Methode. (a) Skizze der Rasierklingenhalterung über dem Deckglas. (b) Schematische Darstellung der Knife-Edge-Methode. Die Rasierklinge wird senkrecht durch den Strahl bewegt und blockiert dabei einen Teil des Lichts, welches vom Detektor registriert wird. Die Rasierklinge kann in x- und z-Richtung verfahren werden.

Zur Vermessung des Durchmessers des HILO-Strahls wurde zunächst ein mit 200nm großen markierten Mikropartikeln (Invitrogen) beschichtetes Deckglas im Probenhalter angebracht. Somit ist es unter Anregungslicht möglich, auf die vom Objektiv abgewandte Oberfläche des Deckglases zu fokussieren. Nun wurde der Beleuchtungsfleck auf der Probe mittels der Iris (siehe Abb. 4.1) soweit verkleinert, dass dessen Abbildung genau die Ränder des Kamerachips berührt (siehe Abb. 4.6). Als nächstes wurde die Rasierklinge mittels des Schrittmotors soweit heruntergefahren, dass sie sich knapp über dem Deckglas befand (überprüfbar durch die komplette Abdeckung des HILO-Strahls), sowie durch die x/y-Mikrometerschrauben genau an den Rand des Beleuchtungsspot's verfahren. An dieser Stelle verlässt der gebrochene Strahl das Deckglas und hat hier auch seinen schmalsten Durchmesser (siehe Abb. 4.5b, Position $x=0$).

Um nun den Durchmesser des HILO-Strahls für verschiedene x-Abstände (siehe Abb. 4.5b)

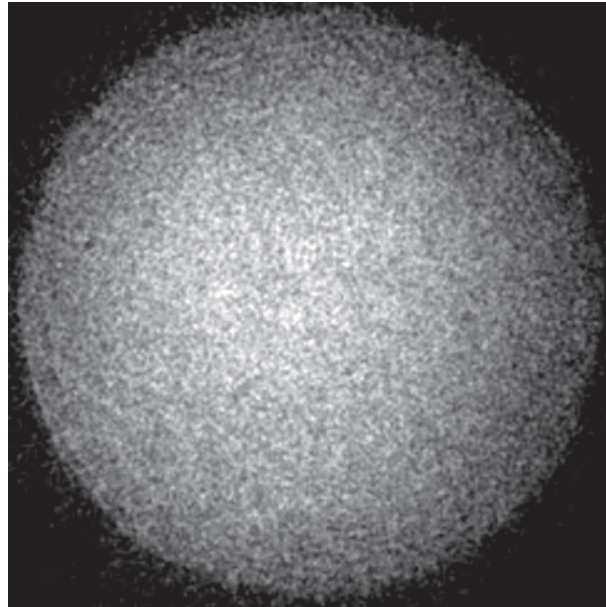


Abbildung 4.6: Abbildung des durch die Irisblende begrenzten Beleuchtungsflecks.

vom Rand des Beleuchtungssspots zu vermessen, wurde die Rasierklinge zunächst auf einer Höhe gehalten und für 10 x-Positionen im Abstand von 0,1mm die Intensität des teilweise abgedeckten Strahls vermessen. Diese 10 Messungen wurden für jeweils so viele z-Positionen wiederholt, dass sich für jede x-Position ein Intensitätsprofil (vom vollständig bedecktem bis zum vollständig unbedeckten HILO-Strahl) ergibt. Zu beachten ist, dass die so gemessenen Intensitätsprofile leicht verbreitert sind, da die Rasierklinge entlang der Senkrechten zum Deckglas (also in z-Richtung) verfahren wird, und nicht entlang der Ebene, die sich transversal zur Ausbreitungsrichtung des Strahls befindet.

Die so für jede x-Position ermittelten Intensitätsprofile wurden dann mit der Gauß'schen Fehlerfunktion angepasst, da von einem gaußförmigen HILO-Strahl ausgegangen wird. Die Anpassung ergibt dann direkt die Parameter der zugrundeliegenden Gaußfunktion, mit welcher das Strahlprofil des HILO-Strahls beschrieben wird. Somit ergeben sich sowohl die Standardabweichung (und daraus die Halbwertsbreite) sowie die z-Position des Mittelpunkts des Strahlprofils für eine gewählte x-Position. Die verschiedenen Kurven der Intensitätsverteilung sind in Abb. 4.7a dargestellt, sowie ein beispielhafter Fit der Intensitätskurve an der Position $x=0\text{mm}$ in Abb. 4.7b.

Messung der Ausdehnung des HILO-Strahls

Für einen Austrittswinkel von 80° und eine Laserwellenlänge von 532nm wurde der Durchmesser des HILO-Strahls in 10 unterschiedlichen x-Abständen zum Austrittspunkt (0-1mm) aus dem

4.2 Charakterisierung der HILO-Beleuchtung

Deckglas bestimmt. Die erhaltenen Intensitätsprofile sind für 5 verschiedene x-Positionen in Abb. 4.7a dargestellt. In Abb. 4.7b ist die Intensitätsverteilung an der Position $x=0\text{mm}$ dargestellt, sowie die angepasste Gauß'sche Fehlerfunktion. Es ergibt sich eine Halbwertsbreite (Durchmesser) des HILO-Strahls von $3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ an dieser Stelle.

Ausgehend von der Ausdehnung des aufs Deckglas auftreffenden Laserstrahls (begrenzt durch die Irisblende) von $R=18\mu\text{m}$ und einem gemessenen Austrittswinkel von $\theta_t = 78,9^\circ$, berechnet sich die theoretische Breite des Strahls nach geometrischen Überlegungen zu $dz = \frac{R}{\tan(\theta_t)} = 3,5\mu\text{m}$ (vgl. Gl.3.38 in Abschnitt 3.3.2 auf Seite 25). Der gemessene Wert stimmt also gut mit dem theoretischen überein.

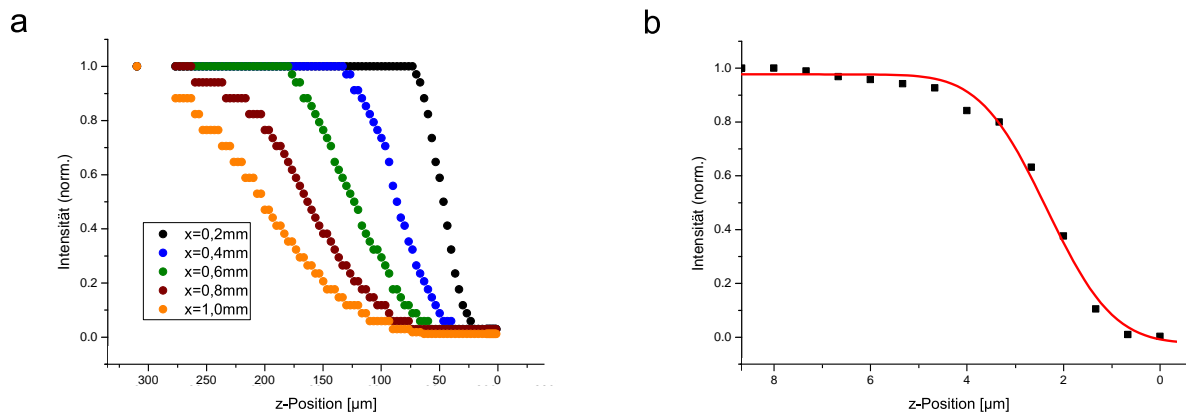


Abbildung 4.7: Der Intensitätsverlauf aufgetragen gegen die relative z-Position der Rasierklinge für verschiedene x-Positionen. (a) Intensitätsverlauf für fünf x-Positionen $> 0\text{mm}$. (b) Beispielhafter Fit der Fehlerfunktion an den Intensitätsverlauf für $x=0$. Der Durchmesser der Irisblende ist $d=0,25\text{cm}$.

Bestimmung der Strahldivergenz und des Austrittswinkels

Für größere x-Abstände vom Austrittspunkt aus dem Deckglas wurde eine Vergrößerung des Durchmessers des HILO-Strahls festgestellt (siehe Abb. 4.8a). Die Halbwertsbreite nimmt dabei linear mit der x-Position zu, wie es für einen Gaußstrahl in großem Abstand zur Strahltaile zu erwarten ist (siehe Gl.3.40 in Abschnitt 3.3.2 auf Seite 25). Aus den Anpassungen der Gauß'schen Fehlerfunktionen an die Intensitätsverteilungen ergibt sich ebenfalls die z-Position des Mittelpunkts des Strahlprofils. Aus der Anpassung einer Geraden $y = mx + b$ an diese Werte (siehe Abb. 4.8b) kann man den Austrittswinkel des HILO-Strahls zu $\theta_t = \tan^{-1}(m)$ zu $78,9^\circ$ bestimmen.

Durchmesser des HILO-Strahls für verschiedene Feldblenden

Der Durchmesser des HILO-Strahls wurde auch für verschiedene Formen der Feldblenden untersucht. Dazu wurde die Irisblende im HILO-Setup (siehe Abb. 4.1) durch einen senkrechten Spalt

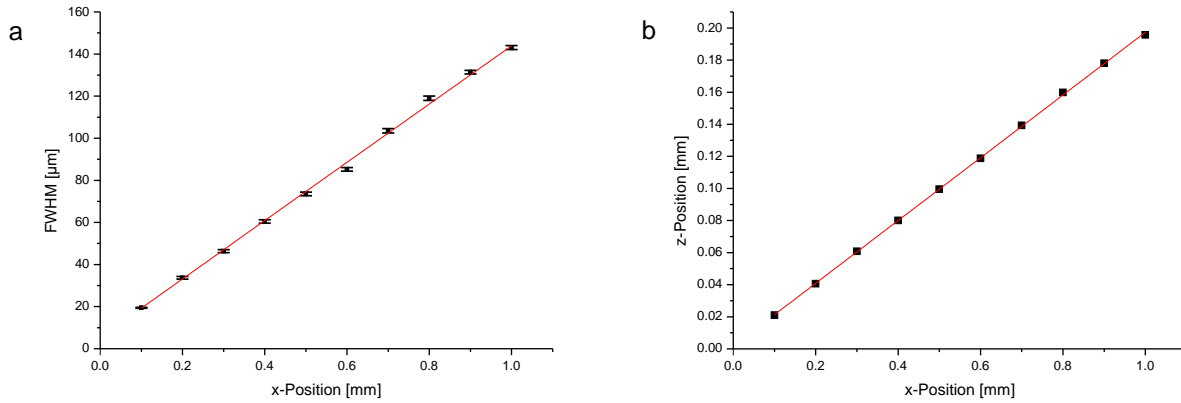


Abbildung 4.8: (a) Halbwertsbreite des HILO-Strahls für verschiedene x-Positionen. (b) Höhe des HILO-Strahls für verschiedene x-Positionen. Die Fehler der z-Position des Strahlmittelpunkts sind zu klein zur Darstellung. Die Daten wurden jeweils mit einer linearen Funktion $y = mx + b$ angepasst.

mit 2cm Höhe und 200 μm bzw. 400 μm Breite ersetzt und die Änderung des Strahldurchmessers gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Breite der Intensitätsverteilungen für die Spalte größer war als für die Irisblende (siehe Abb. 4.9a). Der Durchmesser der Irisblende wurde für diese Messung kleiner gewählt ($d=0,1\text{cm}$), so dass die Abbildung des Beleuchtungsflecks nicht mehr die Ränder des Kamerachips berührt. Die Schwankungen der Intensität beim 200 μm -Spalt sind vermutlich auf Interferenzeffekte zurückzuführen. Da die Verwendung der Irisblende in der kleinsten Halbwertsbreite resultiert (siehe Tab. 4.1) wurde diese für die durchgeführten Messungen verwendet.

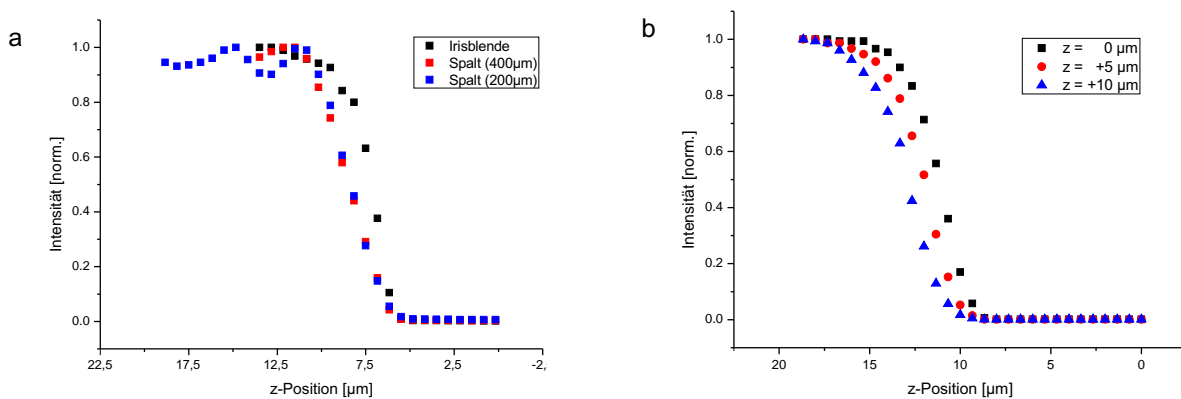


Abbildung 4.9: (a) Intensitätsprofile für drei verschiedene Feldblenden. (b) Intensitätsprofile für drei verschiedene Objektivenpositionen. Die z-Positionen sind relativ zum Deckglas angegeben.

4.2 Charakterisierung der HILO-Beleuchtung

Ergebnis	Feldblende	Iris	Spalt ($400\mu m$)	Spalt ($200\mu m$)
FWHM:		$2,59 \pm 0,13\mu m$	$3,63 \pm 0,08\mu m$	$3,36 \pm 0,18\mu m$

Tabelle 4.1: Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Feldblenden an der Position $x=0$.

Auswirkung des Objektivabstands vom Deckglas

Da während der Betrachtung einer biologischen Probe unter dem Mikroskop oft nachfokussiert werden muss, wurde auch die Auswirkung unterschiedlicher Objektivabstände zum Deckglas untersucht. Dazu wurde das Objektiv aus der auf die Oberseite des Deckglases fokussierten Ausgangsposition einmal um $5\mu m$ und um $10\mu m$ nach oben verfahren und der Strahldurchmesser sowie die Höhe des Strahlmittelpunktes über dem Deckglas jeweils an derselben Position ($x=0$) vermessen.

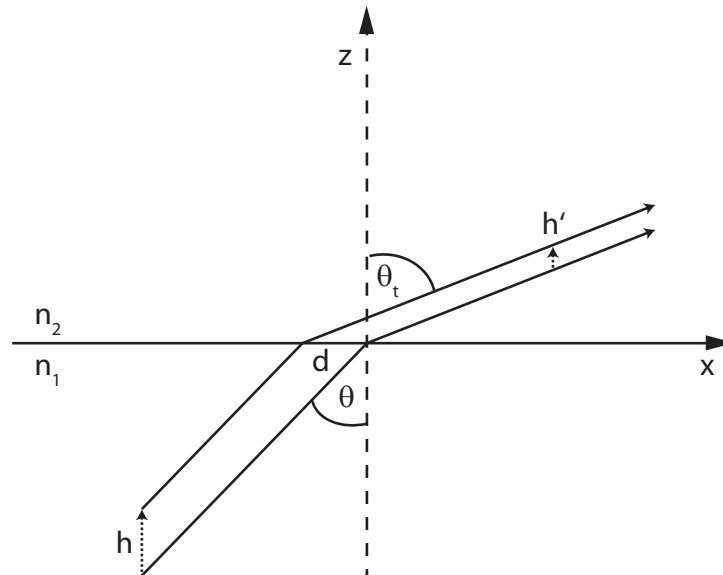


Abbildung 4.10: Darstellung der Änderung der Höhe des HILO-Strahls bei Änderung der Objektivposition relativ zum Deckglas. Gezeigt ist der Mittelpunktstrahl. θ und θ_t sind die Ein- bzw. Ausfallswinkel, h ist die Verschiebung des Objekts, d die seitliche Verschiebung des Auftreffpunkts auf die Grenzfläche und h' die daraus resultierende Höhenänderung des HILO-Strahls.

Bei einer Änderung der Objektivposition ändert sich der Auftreffpunkt des Strahls auf der Grenzfläche zwischen dem Deckglas und dem darüberliegenden Medium (siehe Abb. 4.10). Hier wird vereinfacht angenommen, dass der gesamte Bereich, bestehend aus Objektivlinse, Immersionsöl und Deckglas, den gleichen Brechungsindex von $n=1,51$ besitzt. Wird nun die Position des Objekts in z -Richtung um h verändert, verschiebt sich der Auftreffpunkt des unter dem

Winkel θ auftreffenden Strahls um die Distanz d . Daraus resultiert schließlich die Änderung h' der Position des um den Winkel θ_t gebrochenen Strahls (siehe Abb. 4.10). Es gilt:

$$h' = d \tan(90 - \theta_t) \quad (4.1)$$

$$d = h \tan(\theta) \quad (4.2)$$

$$\Rightarrow h' = h \tan(\theta) \tan(90 - \theta_t) \quad (4.3)$$

Die Messergebnisse geben diese theoretischen Zusammenhänge sehr gut wieder (siehe Tab.4.2). In der Tabelle ist die z-Position des Mittelpunkts des Strahlprofils des HILO-Strahls für drei verschiedene (relative) Objektivpositionen (0,5,10 μm) angegeben, und zwar sowohl die aus obiger Formel berechnete als auch die aus der Anpassung der Gauß'schen Fehlerfunktion erhaltene. Ebenso entspricht die Zunahme des Durchmessers (FWHM) des HILO-Strahls an dieser Position der theoretisch erwarteten. Die theoretisch erwartete Zunahme der Halbwertsbreite bei Verschiebung des Objektivs wurde dabei aus der berechneten Verschiebung d und der Abhängigkeit der Halbwertsbreite von der x-Position des Strahls (linearer Zusammenhang, siehe Abb. 4.8a) ermittelt.

rel. Objektivposition Ergebnis	0 μm	+5 μm	+10 μm
z-Pos. (über DG/theo.):	11,21 μm	12,04 μm	12,87 μm
z-Pos. (über DG/exp.):	11,21 \pm 0,02 μm	12,07 \pm 0,04 μm	12,97 \pm 0,04 μm
FWHM (theo.):	3,27 μm	3,62 μm	3,96 μm
FWHM (exp.):	3,27 \pm 0,08 μm	3,60 \pm 0,11 μm	3,83 \pm 0,11 μm

Tabelle 4.2: Theoretisch berechnete und experimentell gemessene Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Objektivpositionen.

Durchmesser des HILO-Strahls für verschiedene Wellenlängen

Es ist zu erwarten, dass unterschiedliche Wellenlängen einen unterschiedlichen Durchmesser des HILO-Strahls zu Folge haben, da chromatische (Rest-)Aberrationen der Linsen und des Objektivs die Kollimation des aus dem Deckglas austretenden Laserstrahls beeinflussen. Der Durchmesser des HILO-Strahls wurde für die drei verwendeten Anregungswellenlängen (488nm, 532nm, 635nm) bestimmt (siehe Tab. 4.3). Die größeren Werte für die Halbwertsbreiten im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen sind vermutlich auf eine leicht von 0 verschiedene x-Position zurückzuführen. Es zeigt sich eine Änderung des Strahldurchmessers von maximal ca. 10% für die verschiedenen Wellenlängen. Der kleinste Durchmesser von 4,62 μm wird mit der Anregungs-

4.3 Die Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang

wellenlänge von 532nm erreicht.

Wellenlänge	635nm	532nm	488nm
Ergebnis			
FWHM:	$4,78 \pm 0,10 \mu\text{m}$	$4,62 \pm 0,13 \mu\text{m}$	$5,08 \pm 0,26 \mu\text{m}$

Tabelle 4.3: Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Wellenlängen.

4.3 Die Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang

Bereits in der klassischen Mikroskopie ist durch die Abbildung eines Fluorophors mittels Objektiv und Tubuslinse Information über die Position des Moleküls entlang der optischen Achse (z-Richtung) enthalten (siehe [Holt 07]). Befindet sich das Molekül ober- oder unterhalb der Fokusebene des Objektivs wird die Abbildung durch die Punktspreizfunktion verändert, der abgebildete Fleck wird also größer als einer, der von einem Molekül in der Fokusebene stammt. Allerdings kann man bei Abwesenheit von sphärischer Aberration nicht unterscheiden, ob sich das Molekül ober- oder unterhalb der Fokusebene befindet und der Fehler der Lokalisierung nahe der Fokusebene ist sehr groß.

Man kann nun die Lokalisierungsgenauigkeit verbessern und gleichzeitig eine Bestimmung der Position ober- bzw. unterhalb der Fokusebene erreichen, indem man eine schwach fokussierende Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang einfügt [Kao 94]. In dieser Arbeit wurde eine Zylinderlinse mit einer Brennweite von $f=10\text{m}$ verwendet, welche zwischen Notchfiltern und Tubuslinse eingefügt wurde (siehe Abb. 4.11). Diese bewirkt eine Verbreiterung des abgebildeten Flecks in x- bzw. y-Richtung in Abhängigkeit der z-Position des betrachteten Fluorophors. Für die Bilder in Abb. 4.12 wurde ein markierter Mikropartikel jeweils im Fokus und $1\mu\text{m}$ unter- bzw. oberhalb der Fokusebene abgebildet. Dabei wird die Verbreiterung des Flecks in y- bzw. x-Richtung sichtbar, welche allerdings aufgrund von Abbildungsfehlern (z.B.durch versch. Brechungsindizes von Glas und Probe) nicht symmetrisch um den Fokus ist.

4.3.1 Kalibration der z-Positions-Bestimmung

Um aus der Verbreiterung des Abbildungsflecks in x- bzw. y-Richtung eine Information über die z-Position zu erhalten, muss zunächst eine Kalibration durchgeführt werden. Diese wurde zunächst mit fluoreszierenden Mikropartikeln realisiert. Dann wurde erneut eine Kalibration mit doppelt markierten Neutravidin-Molekülen (vgl. Abschnitt 4.4 auf Seite 45) durchgeführt, da diese Fluorophore den in den Experimenten verwendeten Farbstoffen sehr ähnlich bzw. gleich sind.

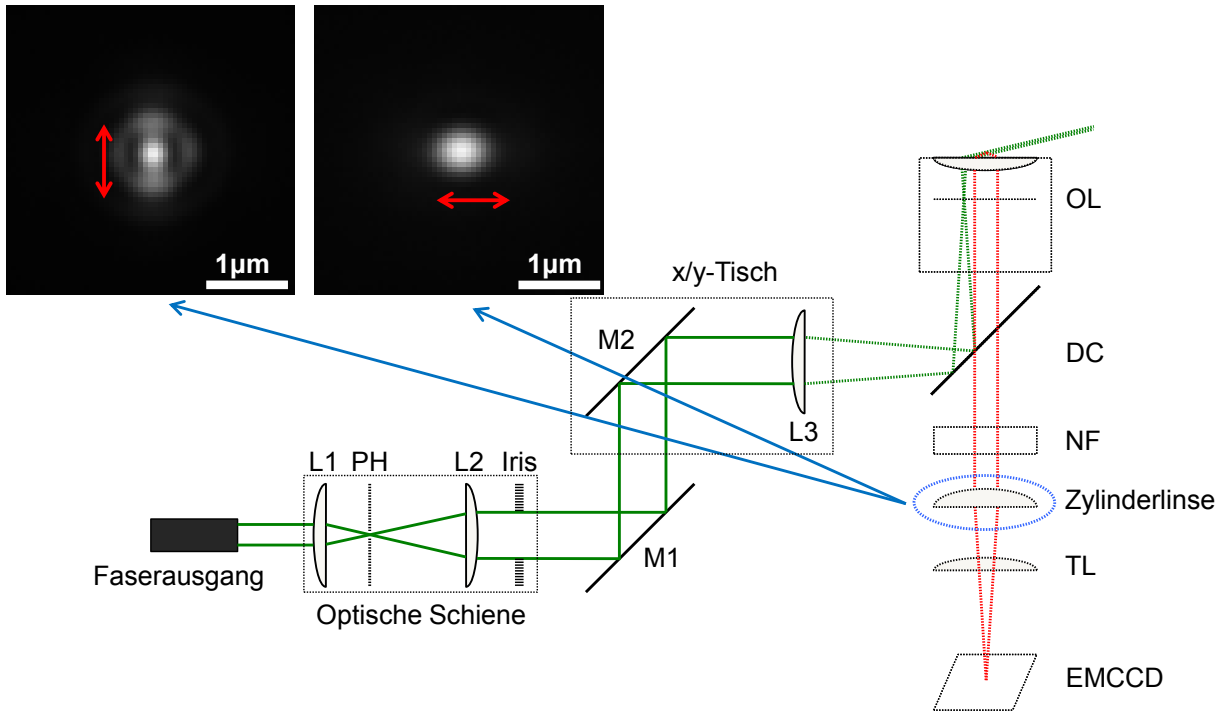


Abbildung 4.11: Skizze des HILO-Aufbaus mit eingefügter Zylinderlinse zwischen Notchfiltern und Tubuslinse. Die Zylinderlinse bewirkt in Abhängigkeit der z -Position eine Verbreiterung der PSF in x - bzw. y -Richtung.

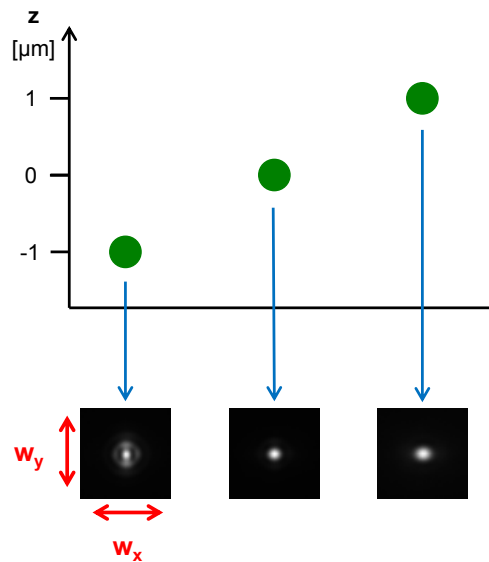


Abbildung 4.12: Veränderung der PSF eines markierten Mikropartikels in Abhängigkeit der z -Position. Unterhalb der Fokusebene (bei $z=0$) ist $w_y > w_x$, oberhalb gilt $w_x > w_y$ (für z -Positionen nahe der Fokusebene).

4.3 Die Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang

Kalibration mittels markierter Mikropartikel

Hierzu wurden markierte Mikropartikel (Beschreibung siehe Abschnitt 4.4) in 1%-Agarose-Gel fixiert und mittels eines Schrittmotors einzelne Partikel in 100nm Schritten in z-Richtung verfahren. An jeder z-Position wurde ein Bild des Mikropartikels aufgenommen und dieses mit einer elliptischen 2D-Gaußfunktion angepasst:

$$f(x, y) = z_0 + Ae^{-\left(\frac{(x-x_c)^2}{2w_x^2} + \frac{(y-y_c)^2}{2w_y^2}\right)} \quad (4.4)$$

Dabei bezeichnet z_0 den konstanten Untergrund, x_c und y_c die Positionen in x- und y-Richtung, und w_x und w_y die jeweiligen Standardabweichungen. Bildet man den Quotienten aus der Breite in x-Richtung w_x und in y-Richtung w_y und trägt diesen gegen die z-Position auf, ergibt sich eine Kurve, welche in einem Bereich von $\approx 1\mu\text{m}$ um die Fokusebene nahezu linear ist (siehe Abb. 4.13). Dieser Bereich um die Fokusebene bei $\frac{w_x}{w_y} = 1$ wurde mit einer Geraden angepasst. Mittels dieser Kalibrierungsgleichung lässt sich nun für jeden abgebildeten Mikropartikel (in der Nähe der Fokusebene) mit einem bestimmten Verhältnis $\frac{w_x}{w_y}$ die z-Position bestimmen.

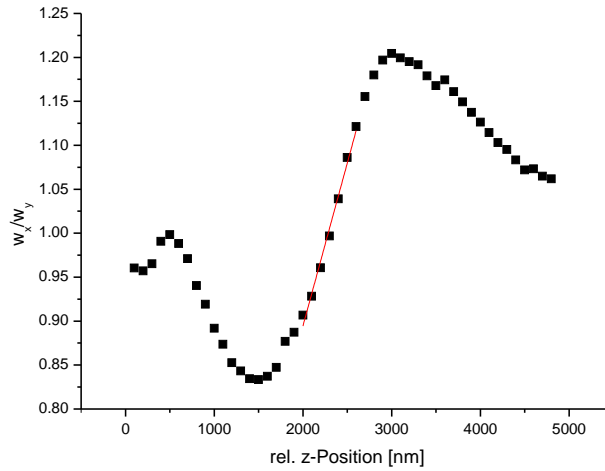


Abbildung 4.13: Kalibrationskurve zur Bestimmung der z-Position. Aufgetragen ist das Verhältnis $\frac{w_x}{w_y}$ gegen die relative z-Position des Schrittmotors. Der zentrale Bereich um $\frac{w_x}{w_y} = 1$ wurde mit einer linearen Funktion angepasst.

Betrachtet man einen markierten Mikropartikel an einer festen z-Position über eine Reihe von z.B. 100 Bildern, sieht man, dass der Quotient $\frac{w_x}{w_y}$ um einen Mittelwert schwankt (siehe Abb. 4.14). Die Standardabweichung dieser Verteilung wird als die Lokalisierungsgenauigkeit interpretiert. Dabei ergibt sich für die sehr hellen Mikropartikel eine Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung von $\sigma_z = 14\text{nm}$. Im theoretischen Idealfall unendlich langer Belichtungszeit würden unendlich viele Photonen detektiert werden und die Breiten w_x und w_y keine Schwankungen

mehr aufweisen. Das heißt, dass also auch $\frac{w_x}{w_y}$ konstant wäre. In diesem Fall würde eine Schwankung des Quotienten $\frac{w_x}{w_y}$ auf eine Bewegung der abbildenden Komponenten des Aufbaus relativ zueinander hinweisen, oder eine Bewegung des betrachteten Fluorophors in z-Richtung. Die gemessene Lokalisierungsgenauigkeit von $\sigma_z = 14nm$ im Fall einer endlichen Anzahl detektierter Photonen ist also eine Obergrenze für die möglichen Bewegungen der Komponenten, der Aufbau ist also in sich sehr rigide. Ebenfalls erkennt man in Abb. 4.14, dass bei jeder zweiten Bewegung in z-Richtung eine größere Distanz zurückgelegt wird. Das ist auf eine Ungenauigkeit in der Positionierung des Schrittmotors zurückzuführen. Deshalb werden zur Erstellung der Kalibrationsgeraden immer mehrere Kurven aufgenommen und der Mittelwert der resultierenden Steigungen berechnet

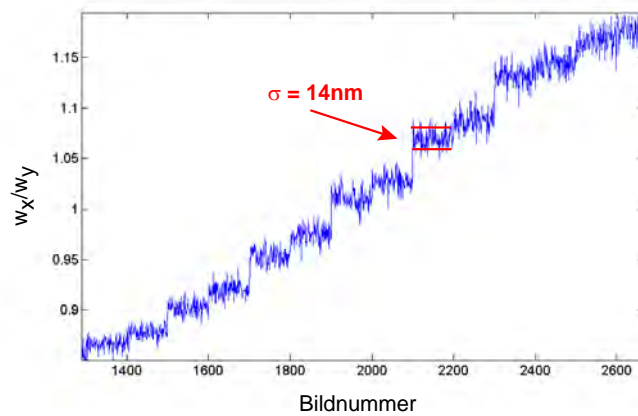


Abbildung 4.14: Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung. Aufgetragen ist das Verhältnis $\frac{w_x}{w_y}$ gegen die Bildnummer. Nach jedem 100. Bild wurde der Mikropartikel mittels des Schrittmotors um 100nm in z-Richtung verfahren. Aus der Schwankung von $\frac{w_x}{w_y}$ um einen Mittelwert lässt sich die Lokalisierungsgenauigkeit zu $\sigma_z = 14nm$ berechnen.

Kalibration mittels doppelt markierter Neutravidin-Moleküle

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sind die Biomoleküle in den untersuchten Proben fast ausschließlich mit den beiden Farbstoffen GFP und AlexaFluor546 markiert. Deshalb wurden die in Abschnitt 4.4 beschriebenen doppelt markierten Neutravidin-moleküle auch benutzt, um Kalibrationskurven zur Bestimmung der z-Position zu erstellen. Dabei zeigt sich, dass es für die bei 525nm und 572nm emittierenden Moleküle unterschiedliche Kalibrationskurven gibt, deren linearer Teil unterschiedliche Steigungen besitzt (siehe Abb. 4.15). Diese Unterschiede ergeben sich aus der jeweiligen Veränderung der Punktspreizfunktion durch die Zylinderlinse für die unterschiedlichen Wellenlängen. Die großen Abweichungen der Werte $\frac{w_x}{w_y}$ für Positionen mit großem Abstand zur Fokusebene ergeben sich aus den schlechten Anpassungen

4.3 Die Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang

der 2D-Gaussfunktion, da hier die detektierte Photonenzahl nur noch sehr klein ist.

Die Kalibrationskurven für Atto488 und AlexaFluor546 wurden mit 10 doppelt markierten Neutravidin-Molekülen ermittelt. An jede Kurve wurde eine Gerade angepasst und daraus die mittlere Steigung berechnet. Für den Farbstoff Atto488 ergibt sich eine Steigung von $m_{Atto488} = 4,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \frac{1}{nm}$, für AlexaFluor546 gilt $m_{AF546} = 2,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \frac{1}{nm}$. Bei der Berechnung der z-Position aus dem Verhältnis $\frac{w_x}{w_y}$ muss für jede Fluorozenzwellenlänge die zugehörige mittlere Steigung verwendet werden.

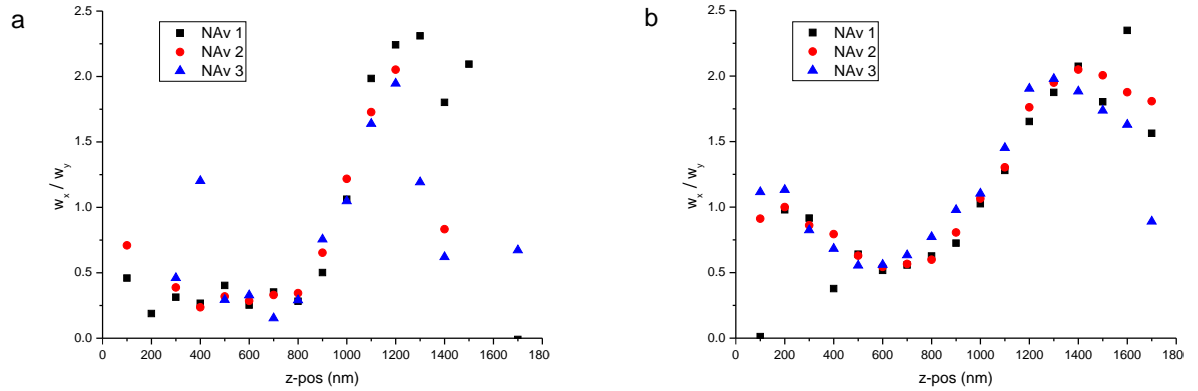


Abbildung 4.15: Kalibrationskurven von jeweils drei Neutravidin-Molekülen für die Farbstoffe (a) Atto488 und (b) AlexaFluor546.

4.3.2 Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung

Im Gegensatz zu Mikropartikeln, welche sehr viele fluoreszente Moleküle enthalten, sind die meisten biologischen Moleküle die untersucht werden, nur mit sehr wenigen oder sogar nur einem Farbstoffmolekül markiert. Dies liegt zum einen an einer begrenzten Anzahl möglicher Bindungsstellen für die Farbstoffmoleküle, zum anderen soll die Funktionalität der Biomoleküle nicht beeinträchtigt werden. Da es aufgrund der geringen Photonenausbeute bei den untersuchten Proben nicht möglich ist, viele Bilder mit einer konstanten, hohen Photonenzahl aufzunehmen, wird die Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung über die Fit-Fehler der Standardabweichung der angepassten Gaußfunktion bestimmt ([DeSa 12]). Es ergibt sich nach Gauß'scher Fehlerfortpflanzung für den Fehler des Quotienten $\frac{w_x}{w_y}$:

$$\Delta z = \sqrt{\left(\frac{1}{w_y} \Delta w_x\right)^2 + \left(\frac{w_x}{w_y^2} \Delta w_y\right)^2} \quad (4.5)$$

Ein Vergleich der so berechneten Werte für die Lokalisierungsgenauigkeit mit denen, welche aus der Standardabweichung des Quotienten $\frac{w_x}{w_y}$ um einen Mittelwert ermittelt wurden, zeigt, dass

erstere eine um etwa 50% kleinere Lokalisierungsgenauigkeit ergeben. Die nach Gl.4.5 berechnete Lokalisierungsgenauigkeit ist also eine obere Abschätzung.

4.3.3 Berechnung von z-Positionen und Abständen

Um aus dem Bild eines Partikels dessen z-Position zu bestimmen, muss zunächst eine zweidimensionale Gaußfunktion angepasst werden. Aus den ermittelten Breiten w_x und w_y und der Steigung m der zugehörigen Kalibrationsgeraden ergibt sich dann für die absolute z-Position im Verhältnis zur Fokusebene bei $\frac{w_{ix}}{w_{iy}} = 1$:

$$z_i = \frac{\frac{w_{ix}}{w_{iy}} - 1}{m_i} \quad (4.6)$$

Für den zugehörigen Fehler der z-Position ergibt sich nach Gauß'scher Fehlerfortpflanzung:

$$\Delta z_i = \sqrt{\left(\frac{1}{w_y m} \Delta w_x\right)^2 + \left(\frac{w_x}{w_y^2 m} \Delta w_y\right)^2 + \left(\left(\frac{\frac{w_x}{w_y} - 1}{m^2}\right) \Delta m\right)^2} \quad (4.7)$$

In den durchgeführten Experimenten soll der Abstand zwischen einem bindenden Transportrezeptor und dem Zentrum der Kernpore bestimmt werden. Diesen berechnet man für zwei beliebige Moleküle, die in zwei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, unter Berücksichtigung des chromatischen Fehlers in z-Richtung (vgl. Abschnitt 4.4 auf Seite 45) zu:

$$(z_1 - z_2) = \frac{\frac{w_{1x}}{w_{1y}} - 1}{m_1} - \frac{\frac{w_{2x}}{w_{2y}} - 1}{m_2} + \Delta z_{chrom} \quad (4.8)$$

Mit dem zugehörigen Fehler:

$$\Delta(z_1 - z_2) = \sqrt{(\Delta z_1)^2 + (\Delta z_2)^2 + (\Delta \Delta z_{chrom})^2} \quad (4.9)$$

4.4 Bestimmung der axialen chromatischen Aberration des Aufbaus

Die verwendeten Objektive von Zeiss weisen trotz aufwendiger optischer Korrekturen eine chromatische Längsaberration auf. Das heißt, dass z.B. ein rot emittierender Farbstoff und ein grün emittierender Farbstoff in unterschiedliche Ebenen abgebildet werden, obwohl sie in derselben

4.4 Bestimmung der axialen chromatischen Aberration des Aufbaus

Emissionsebene liegen. Die Bestimmung der chromatischen Aberration entlang der Richtung der optischen Achse des Objektivs (z-Richtung) erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden.

Für die erste Methode wurden Polymer-Mikrosphären (FluoSpheres, Invitrogen) verwendet, welche mit einer großen Anzahl an Farbstoffen markiert sind und eine hohe Photostabilität besitzen. Da in diesem Experiment zwei unterschiedliche Laserwellenlängen zum Einsatz kamen, wurden sogenannte *TetraSpecks* (200nm Durchmesser, TetraSpeck Fluorescent Microspheres, Invitrogen) verwendet, welche mit vier unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind, die in jeweils anderen Spektralbereichen Fluoreszenzlicht absorbieren bzw. emittieren (360/430 nm (blau), 505/515 nm (grün), 560/580 nm (orange) und 660/680 nm (dunkelrot)).

Für das Experiment wurden die Tetraspecks zur Immobilisierung in ein Agarose-Gel eingebracht und auf einem Deckglas platziert. Dann wurde ein einzelner Tetraspeck gesucht und dieser mittels eines Schrittmotors in 100nm Schritten entlang der optischen Achse bewegt. An jeder z-Position wurde jeweils ein Bild für die beiden Anregungswellenlängen aufgenommen. An das an jeder z-Position aufgenommene Bild des Tetraspecks wurde eine zweidimensionale Gaußfunktion angepasst. Das Maximum dieser Anpassung ist dann ein Maß für die Intensität des betrachteten Tetraspecks an der jeweiligen Position.

Um die Emissionen der grünen und der dunkelroten Fluorophore eines Tetraspecks gut voneinander getrennt abbilden zu können, wurden zusätzlich Filter in den Detektionsstrahlengang eingebracht. Bei Anregung mit 488nm Laserlicht wurde ein Bandpassfilter um 515nm mit einer Breite von 30nm, und bei Anregung mit 635nm Laserlicht ein Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 700nm verwendet.

In Abb. 4.16 ist der Verlauf der Intensität eines Tetraspecks entlang unterschiedlicher z-Positionen, für die beiden Anregungswellenlängen mit entsprechenden Filtern dargestellt. Diese Messung wurde sowohl für ein 63x- als auch ein 100x-Objektiv durchgeführt. An den Bereich in der Nähe des Maximums wurde jeweils eine Gaußfunktion angepasst und aus der Differenz der Lage der Maxima der Gaußfunktionen die chromatische Verschiebung in z-Richtung zu $\approx 1130\text{nm}$ (63x-Ölimmersionsobjektiv) bzw. $\approx 930\text{nm}$ (100x-Ölimmersionsobjektiv) bestimmt.

Die zweite Methode, welche besser auf die späteren Experimente zugeschnitten ist, verwendet anstelle der Tetraspecks zwei einzelne Fluorophore zur Bestimmung der chromatischen Aberration. Es wurde der Farbstoff AlexaFluor546, welcher auch im Experiment eingesetzt wird, und Atto488 als Ersatz für das im Experiment benutzte GFP verwendet. Die Spektren der drei Fluorophore sind in Abb. 5.1 auf Seite 51 dargestellt. Die Verwendung von GFP bietet sich hier nicht an, da dieses nicht sehr photostabil ist (geringe Photonenausbeute) und für diese Kalibrationsmessung relativ große Photonenzahlen benötigt werden.

Zunächst wird ein Deckglas mit einer biotinylierten PEG-Schicht beschichtet (vgl. [Pieh 00]). An die Biotin-Moleküle binden doppelt markierte Neutravidin-Moleküle (siehe Abb. 4.17), welche

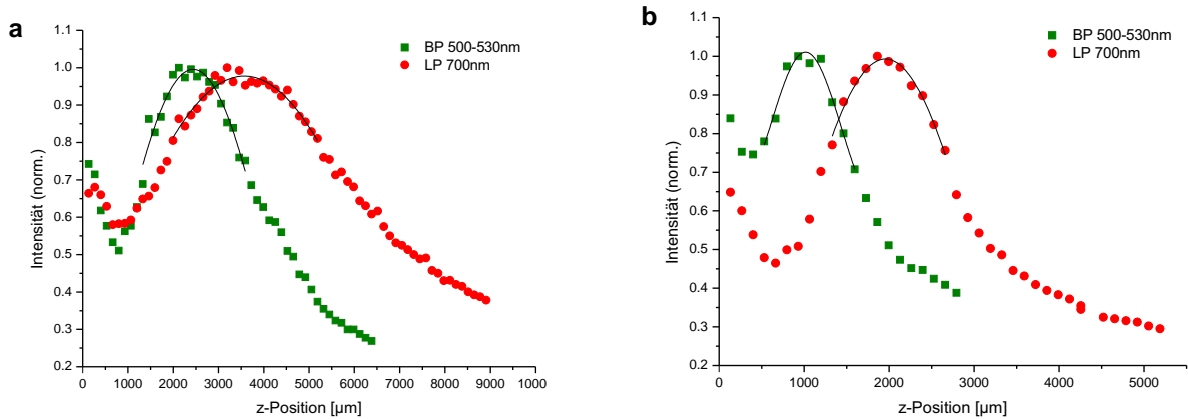


Abbildung 4.16: Detektierte Intensität von Tetraspecks für verschiedene Positionen der Fokusebene entlang der optischen Achse. In grün sind die Datenpunkte dargestellt, welche mit einem Bandpass (500-530nm) im Detektionsstrahlengang aufgenommen wurden, in rot mit einem Langpass ($>700\text{nm}$). a) 63x Objektiv, $\text{NA}=1,4$, $\Delta z_{\text{chrom}} \approx 1130\text{nm}$, b) 100x Objektiv, $\text{NA}=1,45$, $\Delta z_{\text{chrom}} \approx 930\text{nm}$

so auf dem Deckglas fixiert werden. Die Konzentration der markierten Neutravidin-Moleküle wird dabei so gewählt, dass in der Abbildung einzelne Signale gut unterscheidbar sind.

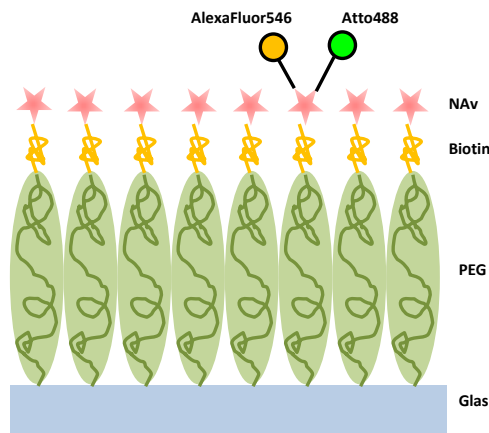


Abbildung 4.17: Die Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546 sind an ein Neutravidin-Molekül gebunden. Dieses wird über die Bindung an eine biotinylierte PEG-Schicht auf dem Deckglas fixiert. Grafik modifiziert nach [Sche 11].

Die so präparierten Proben wurden wiederum mittels eines Schrittmotors in 100nm Schritten entlang der optischen Achse verfahren, nacheinander mit beiden Anregungswellenlängen beleuchtet und die maximale Intensität einzelner Fluorophore durch eine angepasste zweidimensionale Gaußfunktion ermittelt. In Abb. 4.18 ist der Verlauf der Intensität für zwei Fluorophore entlang unterschiedlicher z-Positionen dargestellt. Aus der Differenz der Lage der Maxima lässt sich wiederum die chromatische Verschiebung in z-Richtung bestimmen. Aus 10 solcher Messungen ergab

4.4 Bestimmung der axialen chromatischen Aberration des Aufbaus

sich ein mittlerer Wert von $\Delta z_{chrom} = 108 \pm 24 nm$. Dieser Wert wird im Folgenden zur Korrektur von ermittelten relativen z-Abständen von AlexaFluor546 und GFP verwendet. Diese Messungen wurden nur für das auch in späteren Experimenten verwendete 100x-Objektiv durchgeführt.

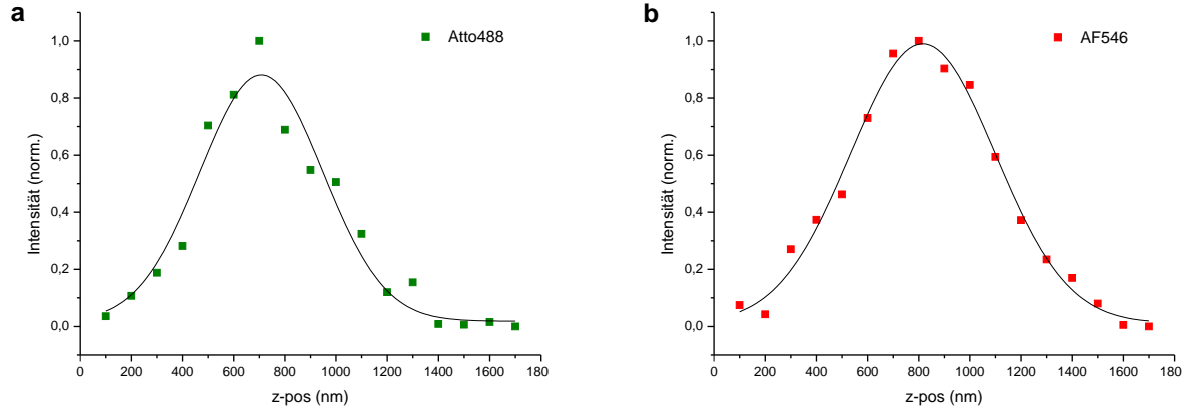


Abbildung 4.18: Darstellung der Intensitätsprofile entlang der z-Richtung für die beiden Farbstoffe Atto488 (a) und AlexaFluor546 (b).

5 Material und Methoden

5.1 Biochemische Methoden

5.1.1 Verwendete Zelllinie

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zum Kern-Zytoplasma-Transport wurde eine stabile HeLa-Zelllinie (ATCC: CCL-2) verwendet, welche ein Fusionsprotein aus dem POM-121 Nukleoporin und dem grün fluoreszierenden Protein (*Green Fluorescent Protein*, GFP) [Tsie 98, Bodo 99] exprimiert. POM-121 befindet sich als integrales Membranprotein in der Mitte der Kernmembran, somit kann anhand des Fluoreszenzsignals des GFP die Position des Kernporenkomplexes bestimmt werden.

5.1.2 Zellkultur

Die HeLa-Zellen wurden aus einer kryokonservierten Sekundärkultur revitalisiert und am Boden von Zellflaschen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zum optimalen Wachstum der Zellen befinden sich diese dabei in einer Nährlösung (Zusammensetzung s.u.). Zur Vorbereitung auf die Experimente wurden die Zellen auf spezielle Petrischalen der Firma MatTeck passagiert, in deren Mitte des Bodens ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 1cm ausgeschnitten ist. Auf dieses Loch ist ein Deckglas mit einer Dicke von 0,17mm geklebt, so dass diese sog. MatTeck-Schalen direkt am Mikroskop verwendet werden können. Zur Umsetzung wurden die Zellen zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und dann durch 2-minütige Inkubation mit 1 mL Trypsinlösung vom Boden der Zellflasche gelöst. Von der Zellsuspension werden dann 1:10 und 1:20 Verdünnungen erstellt und auf den Deckgläschen der Petrischalen ausgesät. Nach ca. 1-2 Tagen sind die Deckgläschen zu ca. 60% konfluent bewachsen und können für die Experimente verwendet werden.

Zusammensetzung des Nährmediums

Als Grundsubstanz wurden 500mL des kommerziell erhältlichen DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) verwendet. Diesem wurden 50mL FCS, 5mL L-Glutamin (200mM) und 5mL Penicillin/Streptomycin (10.000U/10.000µg/mL) beigelegt.

Zusammensetzung des PBS-Puffers

Es wurden 9,55g PBS-Pulver in 1L deionisiertem Wasser gelöst. Vor Verwendung des PBS-Puffers in der Zellkultur wurde dieser bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 min im Autoklaven sterilisiert.

5.1.3 Untersuchte Transportrezeptoren

Zur Untersuchung des Transportprozesses durch die Kernpore wurden in dieser Arbeit die drei Transportrezeptoren NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*), Importin- β 1 und Importin- β 2 (Transportin) im freien und im substratgebundenen Zustand verwendet.

Der Transportrezeptor NTF2 dient zum Import von RanGDP in den Zellkern. Er ist damit essentiell für den Kern-Zytoplasma-Transport. NTF2 formt im freien Zustand ein Homodimer, an welches das RanGDP bindet [Stew 00]. Das Homodimer besitzt eine molekulare Masse von 29,5kDa, RanGDP eine Masse von ca. 26kDa. NTF2 bindet sehr selektiv an FG-Repeats [Morr 03, Isgr 07], was gut in Fluoreszenzaufnahmen erkennbar ist, in denen mit einem Farbstoff markiertes NTF2 zur Detektion der Kernporen verwendet wird [Kubi 05].

Die sogenannten β -Karyopherine, welche zu den wichtigsten Importfaktoren gehören, sind relativ große Proteine mit einer Masse von bis zu 115kDa. Die in dieser Arbeit verwendeten β -Karyopherine Importin- β 1 und Importin- β 2 (Transportin 1) haben ein Molekulargewicht von 61,9 kDa bzw. 97 kDa.

Importin- β 1 bindet nicht direkt an die NLS-Sequenz des zu transportierenden Substrats (GST-NLS), sondern an eine Importin- β -Bindende-Domäne (*Importin-Beta-Binding-Domain, IBB - Domain*) des Rezeptors Importin- α 1 welcher wiederum an die NLS-Sequenz des Substrats bindet. Das Fusionsprotein GST-NLS wurde durch heterologe Expression und anschließende Aufreinigung über Affinitätschromatographie gewonnen und besitzt ein Molekulargewicht von 30 kDa.

Nach der Translokation durch die Kernpore ins Kerninnere sorgt die Bindung von RanGTP an Importin- β 1 für eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bindung zum Substrat unterbrochen wird. Durch das Ablösen von Importin- β 1 vom Importkomplex ändert sich die Konformation der Importin- β -Bindenden-Domäne wodurch es ebenfalls zu einer Lösung der Bindung zwischen Importin- α 1 und Substrat kommt.

Importin- β 2 bindet direkt an eine NLS-Sequenz des Substrats M3. Auch diese Verbindung wird bei Bindung von RanGTP an Importin- β 2 gelöst und so das Substrat im Zellkern freigesetzt.

5.1.4 Proteinmarkierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Transportrezeptoren wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor546 der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll markiert. Es wurde das Maleimid-

5.1 Biochemische Methoden

Derivat des Farbstoffes verwendet, um selektiv freie Thiolgruppen der Proteine zu markieren. Das Absorptionsmaximum liegt bei 546nm und das Emissionsmaximum bei 572nm (siehe Abb. 5.1c). Die fluoreszenzmarkierten Transportrezeptoren wurden in 10µL Aliquots bei -80°C gelagert.

Weitere Fluorophore

Weitere Fluorophore waren Atto488, welches bei Kalibration des Aufbaus verwendet wurde, und das mit POM-121 fusionierte GFP in den Kernporen. Das Absorptionsmaximum liegt für GFP bei 490nm und das Emissionsmaximum bei 510nm. Für Atto488 liegt das Absorptionsmaximum bei 501nm und das Emissionsmaximum bei 525nm. Die Spektren sind in Abb. 5.1a und Abb. 5.1b dargestellt.

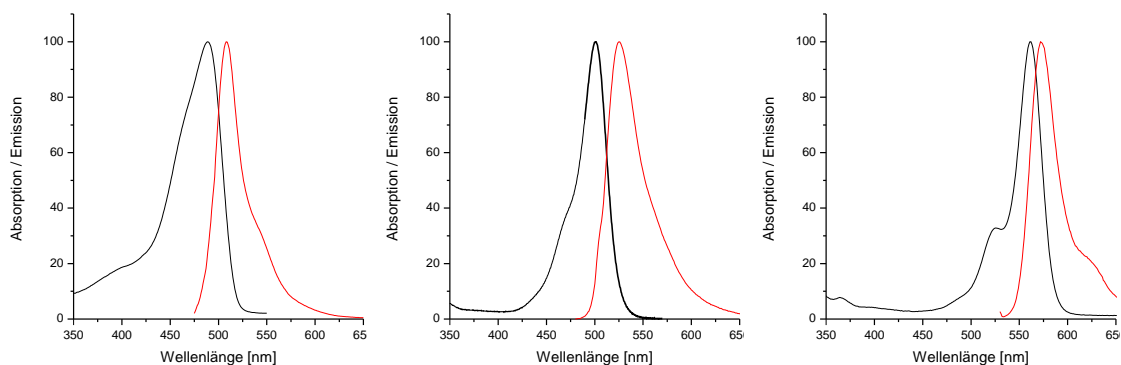


Abbildung 5.1: Absorptions- und Emissionsspektren (schwarz bzw. rot) der Fluorophore GFP (a), Atto488 (b) und AlexaFluor546 (c).

5.1.5 Funktionalität der Transportrezeptoren

Um die Transportrezeptoren auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wird ihre Affinität zum Kernporenkomplex überprüft. Dazu wird zunächst ein Bild der GFP-markierten Kernporen an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns einer permeabilisierten Zelle aufgenommen. Die Zelle wird dann unter maximaler Leistung des 488nm Lasers beleuchtet, um in kurzer Zeit alle GFP-Moleküle zu bleichen. Es ist nun keine Fluoreszenz an den Kernporen mehr zu erkennen. Dann wird eine Transportlösung, welche den markierten Transportrezeptor in hoher Konzentration enthält, auf die Zelle gegeben. Nach wenigen Minuten sammelt sich der Transportrezeptor an den Kernporen an und macht deren Position wieder sichtbar. In Abb. 5.2 ist dies beispielhaft für den mit AlexaFluor546 markierten NTF2 Transportrezeptor dargestellt. Die Interaktion von Transportrezeptoren und den zugehörigen Substraten wurde mit Pulldown-Assays kontrolliert.

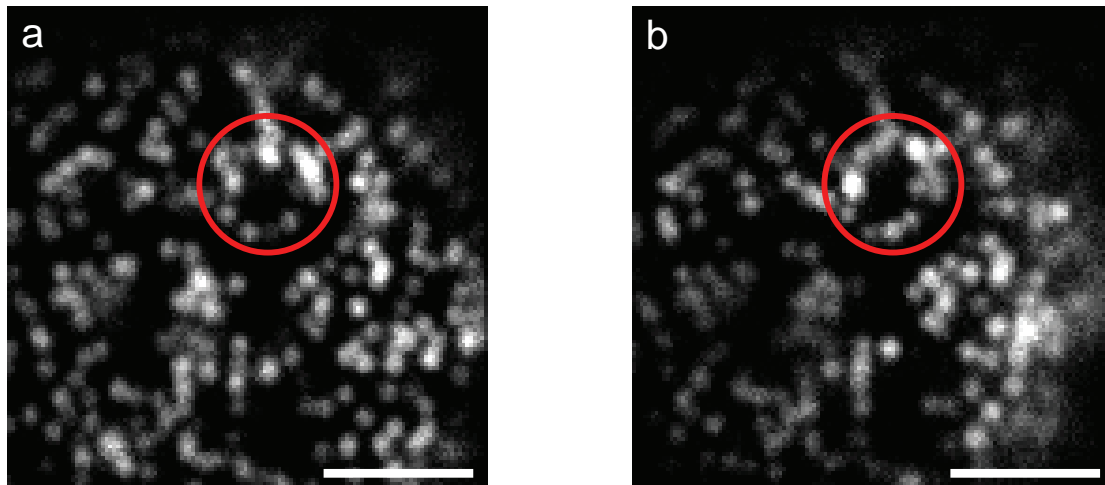


Abbildung 5.2: Kolokalisation der Signale von GFP und AlexaFluor546 an den Kernporen. (a) Kernporen markiert mit GFP. (b) Signale von AlexaFluor546-NTF2 an den Positionen der Kernporen nach photobleichen der GFP. Balken = 2,5µm.

5.1.6 Präparation der Zellen

Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen zunächst dreimal mit Transportpuffer gewaschen, um die Nährlösung zu entfernen. Danach wurden sie mit einer 0,2% Digitonin-Lösung für 4 Minuten auf Eis inkubiert. Hierdurch wird die äußere Zellmembran permeabilisiert, so dass später die freien bzw. substratgebundenen Transportrezeptoren leicht ins Zellinnere eindringen können. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder drei mal mit Transportpuffer gewaschen, um die Digitonin-Lösung zu entfernen und eine weitere Zersetzung der Zellmembran zu verhindern. Zuletzt wurde die Lösung, welche die zu untersuchenden Transportrezeptoren enthielt, zugegeben.

Zusammensetzung des Transportpuffers

Der Transportpuffer setzt sich zusammen aus 20mM HEPES, 110mM Kaliumacetat, 5mM Natriumacetat, 2mM Magnesiumacetat und 1mM EGTA. Für die Verwendung in den Experimenten wurde zusätzlich DTT mit einer Endkonzentration von 2mM beigegeben. Mittels einer 2M Kaliumhydroxidlösung wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt.

5.1.7 Präparation der Zellproben

Es wurden die Transportprozesse dreier verschiedener Transportrezeptoren jeweils mit und ohne ihr spezifisches Substrat untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transportrezeptoren NTF2, Imp β 1 und Imp β 2 (Transportin) wurden alle mit dem Farbstoff AlexaFluor546 markiert. Dadurch konnten für alle betrachteten Transportprozesse dieselben Messbedingungen

5.2 Durchführung der Experimente

verwendet werden.

Anhand des freien Transportrezeptors NTF2 soll nun kurz die Vorbereitung einer Lösung, die den Transportkomplex enthält, beschrieben werden. In die Vertiefung der MatTeck-Schale, in der sich die Zellen auf dem Deckglas befinden, passen ca. 250µl Flüssigkeit. Es wurden daher immer Transportmischungen mit einem Gesamtvolumen von 300µl hergestellt, von denen dann 250µl für das Experiment verwendet wurden. Dabei wurde der in einer hohen Konzentration vorliegende fluoreszenzmarkierte Transportrezeptor zunächst in mehreren Schritten in Transportpuffer auf eine passende Konzentration verdünnt. Transportkomplexe wurden zunächst zusammengemischt und für 10 Minuten inkubiert, um eine Bindung zwischen Transportrezeptoren und dem zugehörigen Substrat zu erreichen. Dann wurde die Transportmischung auf die Zellen gegeben. Nach 1-2 Minuten Inkubation wurde die Messung gestartet.

5.1.8 Zusammensetzung der verwendeten Proben

Die Konzentration des freien Transportrezeptors NTF2 in der Transportmischung betrug 17nM. Für substratgebundenes NTF2 wurde 480nM RanGDP zugegeben.

Der freie Transportrezeptor Impβ1 wurde den Zellproben in der Konzentration von 4nM beigegeben. Anstelle eines ATP regenerierenden Systems wurden dem Transportgemisch 2mM ATP und 2mM GTP beigelegt, sowie nicht fluoreszenzmarkiertes freies NTF2 in der Konzentration 1µM. Für substratgebundenes Impβ1 wurden zusätzlich 10nM Impα1 und 23nM GST-NLS hinzugefügt. Das Substrat liegt in 4-fach höherer Konzentration vor als der Transportrezeptor um die Bildung von Transportkomplexen zu erleichtern.

Für Impβ2 bestand das Transportgemisch aus 15nM Impβ2, 2mM ATP, 2mM GTP und 1µM unmarkiertem NTF2, sowie zusätzlich 33nM M3 für die Untersuchung des substratgebundenen Rezeptors.

5.2 Durchführung der Experimente

Am Mikroskop wurde zunächst per Auge am Okular eine Zelle im Durchlicht gesucht und in den Fokus gebracht. Dann wurde das Durchlicht ausgeschaltet und die Probe mit dem Laser der Wellenlänge 488nm im EPI-Modus beleuchtet. Dadurch wurden die markierten Kernporen der Zelle sichtbar. Nun wurde das Objektiv auf die dem Deckglas zugewandte Unterseite des Zellkerns fokussiert, erkennbar an der dichten Ansammlung der Kernporen in einem kreisförmigen Bereich (im Gegensatz zum ringförmigen Bild der Kernporen in der Äquatorebene, siehe Abb. 2.5). Der Laser ist dabei auf die geringste mögliche Intensität eingestellt, bei der die Kernporen gerade noch sichtbar sind, da die GFP-Moleküle sehr schnell bleichen.

Nun wird der Beleuchtungsstrahl durch Drehen einer Mikrometerschraube am x/y-Tisch (vgl.

Abb. 4.1 auf Seite 30) langsam in den HILO-Modus gefahren. Der Strahl wird dabei gekippt, bis er das Objektiv unter einem sehr großen Winkel verlässt. Der HILO-Winkel wird so eingestellt, dass der Kontrast für die Kernporen an der Unterseite des Zellkerns maximal wird (der Winkel kann je nach Zelle unterschiedlich sein).

Nun wurden zunächst 10 Bilder der Kernporen durch Anregung der GFP-Moleküle mit 488nm aufgenommen. Die Bilder mit einer Belichtungszeit von 50ms wurden aufsummiert und als Einzelbild gespeichert. Dieses Bild wurde als Referenz der Kernporenposition zur Auswertung verwendet. Danach wurden automatisch unter Belichtung mit 532nm 10 Bildstapel mit jeweils 1000 Bildern und einer Belichtungszeit von 2,1ms pro Bild aufgenommen. Diese beiden Schritte wurden solange wiederholt, bis die GFP-Moleküle in den Kernporen geblichen waren.

In Abb. 5.3 sind beispielhaft ein solches Referenzbild sowie diverse Einzelbilder des zugehörigen Bildstapels gezeigt. Man sieht sowohl ein Fluoreszenzsignal an einer Position einer Kernpore (siehe Pfeil) als auch ein Signal in geringer Distanz zur Porenposition, welches keiner Kernpore zugeordnet werden kann. Hierbei kann es sich um eine unspezifische Bindung des Transportrezeptors an die Kernmembran handeln. Eine weitere Möglichkeit ist, dass an dieser Position eine Kernpore vorhanden ist, diese aber z.B. wegen Fluoreszenzbleichung des GFP nicht sichtbar ist.

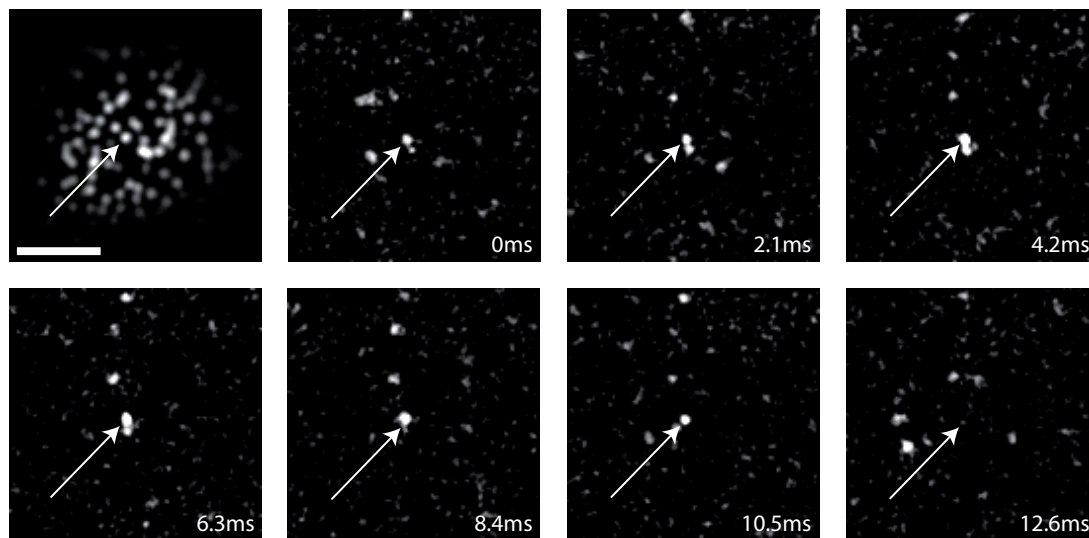


Abbildung 5.3: Im ersten Bild ist die dem Deckglas zugewandte Unterseite einer HeLa-Zelle gezeigt, deren Kernporen mit GFP markiert sind. In den folgenden Bildern ist ein an eine Kernpore bindender und sich wieder lösender Transportrezeptor (NTF2, siehe Pfeil) dargestellt (siehe Text). Balken = 2,5µm.

5.3 Auswertung der Bildstapel

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) und der Programmierumgebung MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) durchgeführt.

Als erstes wurden die aus der Kamera-Software (Andor Solis, Andor Technology plc, Belfast, Nordirland) gewonnenen Bilder und Bildstapel in ImageJ importiert und dort mittels eines Plugins vom proprietären SIF-Format in das TIFF-Format umgewandelt. Als nächstes wurde von allen Bildstapeln, welche die Transportrezeptordynamik abbilden, der Hintergrund subtrahiert; dazu wurde jeweils der Mittelwert des gesamten Bildstapels ermittelt und anschließend von jedem Einzelbild abgezogen. Dadurch wurde die verbleibende Hintergrundfluoreszenz im Bild reduziert.

Danach wurden die Positionen der Kernporen in den Übersichtsbildern ermittelt. Dazu wurden in den aufsummierten Einzelbildern der GFP-Signale einer untersuchten Zelle die Kernporenpositionen zunächst manuell bestimmt. Hierfür wurde die Position des hellsten Pixels eines geeigneten GFP-Signals ermittelt und als x/y-Positionen in eine ASCII-Datei exportiert. Hierbei wurden nur Poren ausgewählt, welche einen genügend großen Abstand (> 6 Pixel = 360nm) von anderen Poren hatten (vgl. [Kubi 96]), so dass in der weiteren Auswertung die Position der Pore gut mittels Anpassung einer 2D-Gaußfunktion bestimmt werden konnte und keine Falschzuweisungen von Bindungsereignissen an einer nah benachbarten Pore erfolgten. Die manuelle Selektion geeigneter GFP-Signale hat sich hierbei als effizienteste Methode erwiesen. Wenn in einem Kernporenbild die GFP-Moleküle bereits zu stark geblichen waren, wurde dieses und alle chronologisch folgenden Bilder verworfen (sowie die 10 zuvor aufgenommenen Bildstapel) und nicht weiter ausgewertet. Ebenso wurden Bilder verworfen, wenn die Position einer Kernpore in den Referenzbildern einer Zelle um mehr als 30nm von der Position im ersten Referenzbild abwich, um eine Bewegung der Zelle auszuschließen. Dies kam bei ca. 15% der betrachteten Zellen vor.

Die weitere Auswertung der Bildstapel zur Bestimmung der Bindungszeiten und der räumlichen Verteilungen an die Kernpore bindender Rezeptoren gliedert sich in drei Schritte:

- Bestimmung der Intensitätszeitreihe über den Kernporen
- Selektion von Bindungsereignissen
- Anpassung einer 2D-Gaußfunktion an die Bindungsereignisse

5.3.1 Bestimmung der Intensitätszeitreihe über den Kernporen

Im ersten Teil werden zunächst die manuell ermittelten Positionen der Kernporen eingelesen. Dann wird der erste Bildstapel eingelesen und als 3D-Matrix im Speicher abgelegt. Nun wird

aus dem Original-Bildstapel ein Unterbildstapel ausgeschnitten und zwar innerhalb eines Bildbereiches (*region of interest*, ROI) mit einem Radius von 3 Pixeln um die Position der Kernpore. Eine genaue Bestimmung der Position der Kernpore mittels Anpassung einer Gaußfunktion ist hier nicht erforderlich, da die Anpassung eine Sub-Pixel genaue Position ergeben würde, aber in Matlab Matrizen nur mit ganzen Matrixpositionen (also pixelgenau) gearbeitet wird. Für diesen Unterbildstapel wird nun in jedem Bild der Mittelwert der Intensität berechnet und gespeichert. Die so erhaltene mittlere Intensitätszeitreihe wird für jede der Kernporenpositionen des untersuchten Zellkerns durchgeführt. Mit den weiteren Bildstapeln wird genauso verfahren.

Vorläufige Selektion von Bindungsereignissen

Im nächsten Schritt werden die (vorläufigen) Bindungsereignisse definiert. Dazu wird zunächst ein Histogramm der gemittelten Intensitäten der Intensitätszeitreihe einer ROI erstellt. Dieses weist einen großen Peak bei kleinen Intensitäten auf (Hintergrund) und einige wenige Einträge bei hohen Intensitäten (siehe Abb. 5.4a). An dieses wird mit dem in Matlab implementierten nichtlinearen *least squares* (Methode der kleinsten Quadrate) Algorithmus (nach dem Trust-Region-Verfahren) eine Gauß-Funktion angepasst:

$$f(x) = y_0 + Ae^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (5.1)$$

Da innerhalb eines Bildstapels nur sehr wenige Bindungsereignisse an einer Kernpore stattfinden (beeinflussbar durch die verwendete Konzentration der Transportrezeptoren) gibt der Mittelwert μ der Gaußfunktionen also in guter Näherung den Mittelwert der Hintergrundintensität wieder. Als Bedingung für ein Bindungsereignis wird definiert, dass für die mittlere Intensität $\langle I \rangle$ des Signals eines Rezeptors gilt (siehe Abb. 5.4b:

$$\langle I \rangle > \mu + n \cdot \sigma \quad (5.2)$$

Hier ist σ die Standardabweichung der Anpassung der Gaußfunktion, und $S = \mu + n \cdot \sigma$ wird als Schwellenwert bezeichnet. In der Analyse der Daten wurden verschiedene Werte für den Schwellenwertfaktor n eingesetzt ($n = 5..10$) um den Einfluss des so gewählten Schwellenwerts auf die Ergebnisse zu untersuchen. Zwei Bindungsereignisse an einer Kernporenposition, zwischen denen die mittlere Intensität nur für ein Bild unter den Schwellenwert fällt, werden dabei zu einem Bindungsereignis zusammengefasst. Damit soll ausgeschlossen werden, dass Ereignisse, bei denen das Fluorophor innerhalb der Bindungszeit blinkt, als zwei kürzere Ereignisse registriert werden oder verworfen werden. Alle so gefundenen Bindungsereignisse von Transportrezeptoren an die

5.3 Auswertung der Bildstapel

Kernporen werden in einer neuen Ereignis-Matrix gespeichert, in der alle wichtigen Parameter eines Bindungsereignisses hinterlegt sind (unter anderem die Ergebnisse der Anpassungen der Gaußfunktionen, die Kernporenposition, Schwellenwert, Ereignisdauer und die mittlere Intensität für jedes Einzelbild).

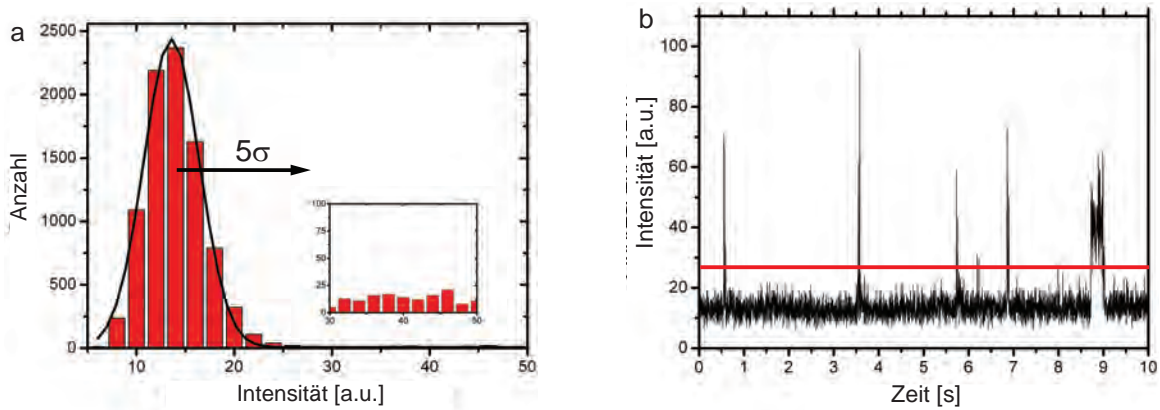


Abbildung 5.4: (a) Verteilung der Intensitäten über den gesamten Unterbildstapel und angepasste Gaußfunktion. Ausschnitt: Bereich mit Intensitäten $\langle I \rangle > \mu + n \cdot \sigma$, also mögliche Bindungsereignisse. (b) Intensitätsverlauf mehrerer Unterbildstapel (aneinandergehängt), aufgetragen gegen die Zeit. In rot ist die Größe des Schwellenwerts dargestellt.

5.3.2 Anpassung einer 2D-Gaußfunktion an die Bindungsereignisse

Im dritten Schritt werden nun an die so gefundenen Bindungsereignisse (elliptische) 2D-Gaußfunktionen angepasst:

$$f(x, y) = z_0 + Ae^{-\left(\frac{(x-x_c)^2}{2\sigma_x^2} + \frac{(y-y_c)^2}{2\sigma_y^2}\right)} \quad (5.3)$$

Dazu werden wiederum Unterbildstapel gebildet, diesmal mit einem Radius von 10 Pixeln um die Porenposition. Dieser Radius wird in dieser Größe gewählt, um eine möglichst gute Anpassung an die abgebildeten Punktspreizfunktionen der Fluorophore zu ermöglichen. Diese werden je nach Abstand zur Fokusebene durch die eingefügte Zylinderlinse in x- oder y-Richtung vergrößert und sind somit ausgedehnter, als es eine normale Punktspreizfunktion wäre (vgl. Abschnitt 4.3 auf Seite 39). Gleichzeitig werden auch die Fehler der Funktionsanpassung für die Standardabweichung in x und y (sowie die Fehler aller anderen Parameter) berechnet. Weiterhin wird die Anpassungsgüte (*goodness-of-fit*) der Gaußfunktion bestimmt. Dazu wird das Bestimmtheitsmaß R^2 (*Coefficient of determination*) folgendermaßen berechnet:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (5.4)$$

Hier sind y_i die gemessenen Werte in jedem Pixel, f_i die angepassten Werte und \bar{y} der Mittelwert aller y_i . Der R^2 -Parameter beschreibt also die Güte der angepassten Gaußfunktionen an die reale Intensitätsverteilung des Bildes und ist klein für Verteilungen, die stark verrauscht sind. Die 2D-Gaußfunktionen werden ebenfalls in den Einzelbildern der Kernporenkomplexe an jedes Kernporenbild angepasst. Als Startwerte für die Anpassungsparameter dienen dabei die zuvor manuell ermittelten Positionen der Kernporenzentren.

Die in diesem Schritt ermittelten Größen der Anpassungsparameter für die Bilder der Transportrezeptoren und der Kernporen sowie die Fehler dieser Größen werden zu den jeweiligen Ereignissen in der Ereignis-Matrix hinzugefügt. Weiterhin werden auch die z-Positionen mitsamt ihrer Fehler (siehe Abschnitt 4.3.3 auf Seite 44) berechnet und eingetragen. Die Ereignis-Matrix wird gespeichert und kann nun selektiv ausgewertet werden.

5.3.3 Selektion der Bindungsereignisse

Mittels eines weiteren MATLAB-Programms werden nun die zuvor gefundenen Ereignisse noch einmal selektiert. Es werden nur diese Ereignisse als Bindungsereignisse ausgewertet, für die gilt:

- Der Abstand zwischen den angepassten Werten für die Porenposition und des Transportrezeptors muss kleiner als 120nm sein.
- Für die Anpassungsgüte muss gelten $R^2 > 0,2$.

Durch die Einschränkung auf einen Bereich von 120nm um die Porenposition werden solche Ereignisse ausgeschlossen, welche z.B. von einer unspezifischen Bindung eines Transportrezeptors an der Kernmembran stammen, aber ebenfalls in der ROI der betrachteten Pore zu einer Erhöhung der Intensität über den Schwellenwert beitragen.

Der zweite Punkt dient dem Ausschluss von Ereignissen, welche zwar den Schwellenwert überschreiten und deren angepasste x/y-Position auch zentral ist, deren Abbildung aber „verschmiert“ ist. Ursachen dafür sind z.B. die Bewegung des Rezeptors im Beobachtungszeitraum eines Bildes oder ein/mehrere weitere sich in unmittelbarer Nähe befindliche Transportrezeptoren. Diese Bedingung dient auch dem Ausschluss durch die 2D-Gaußfunktion schlecht angepasster Ereignisse, welche sich nicht zur Positionsbestimmung eignen (siehe Korrelation zwischen R^2 und Lokalisierungsgenauigkeit in Abb. 6.9). Die Qualität der Bindungsereignisse wurde vor und nach

5.3 Auswertung der Bildstapel

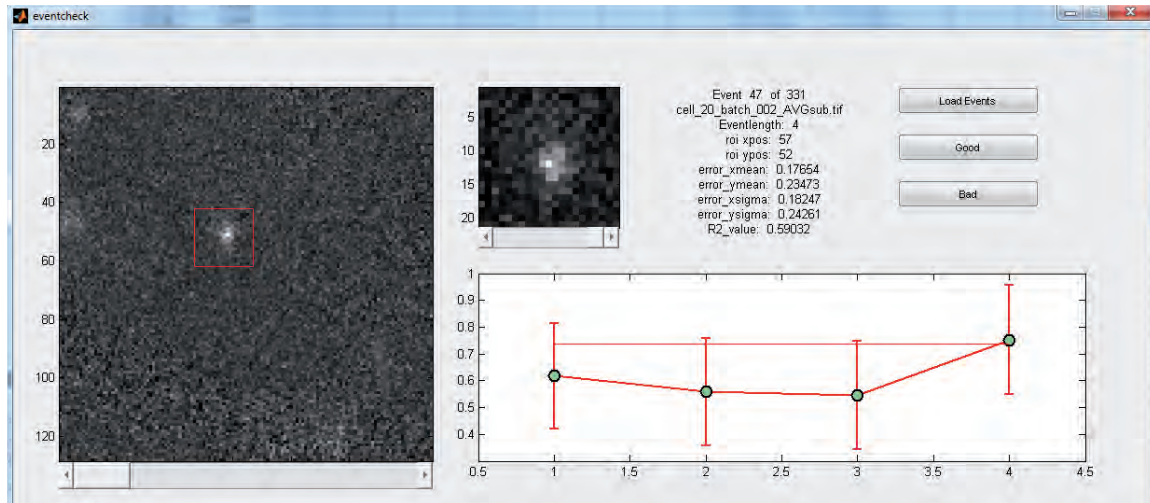


Abbildung 5.5: Darstellung einzelner Bindungsereignisse in einem Übersichtsprogramm (in Matlab). Rot umrandet ist ein Bereich mit einem Radius von 10 Pixeln um eine Kernporenposition, welches nochmal vergrößert daneben dargestellt ist. Im rechten unteren Fenster ist der Quotient $\frac{w_x}{w_y}$ für die Kernpore (rote Linie) und den Transportrezeptor (plus Fehler) gegen die Bildnummer aufgetragen.

der Bestimmung dieser Kriterien manuell überprüft und die Kriterien dementsprechend angepasst (siehe Abb. 5.5). Aus den verbleibenden Bindungsereignissen werden im folgenden die Bindungszeiten der freien und substratgebundenen Transportrezeptoren an der Pore, sowie die Verteilungen der r- und z-Positionen bestimmt.

6 Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit realisierten Mikroskopaufbauten zur TIRF- und HILO-Beleuchtung eignen sich vor allem zur Beobachtung von Prozessen nahe der Oberfläche des Deckglases. Anwendungen der TIRF-Mikroskopie sind zum Beispiel die Abbildung der Endo- und Exozytose von Vesikeln an der Zellmembran [Stey 97], die Untersuchung des Transports von Molekülen zur Zellmembran, die Abbildung von Bindungen zwischen Liganden und ihren membrangebundenen Rezeptoren, sowie die Abbildung des Zytoskeletts [Merr 99].

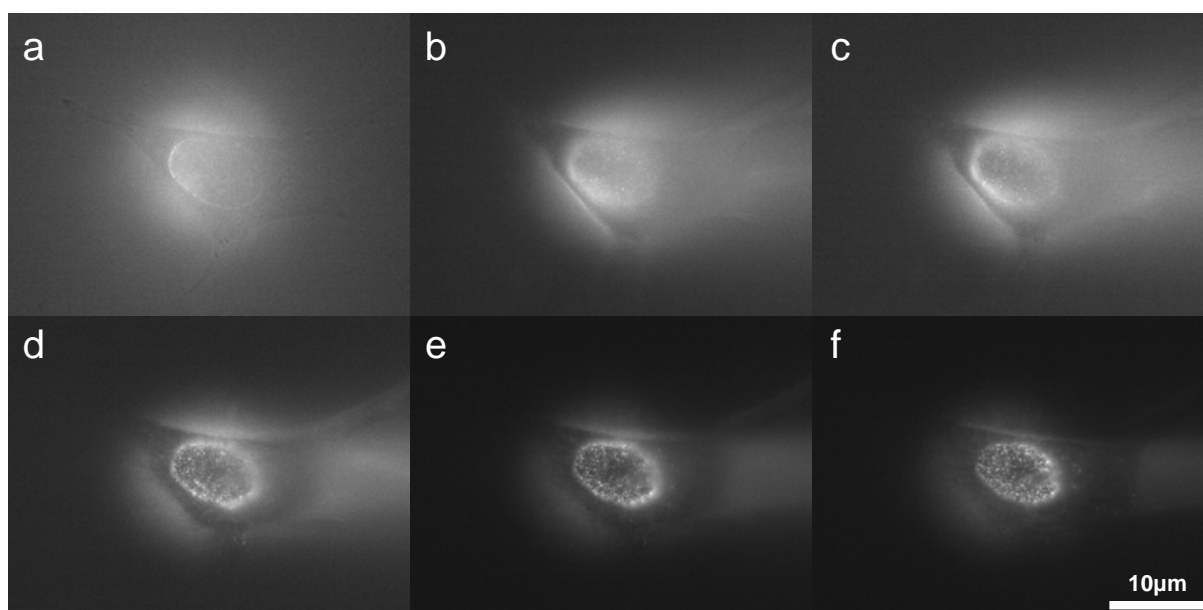


Abbildung 6.1: Aufnahmen einer HeLa-Zelle, deren Kernporen mit GFP markiert sind, unter versch. Austrittswinkeln des Laserstrahls aus dem Objektiv. Der hellere Bereich rechts der Zelle zeigt die Richtung des gebrochenen Strahls an. (a) EPI-Beleuchtung, (b)-(f) HILO-Beleuchtung mit steigendem Winkel. Balken = 10µm.

Weiterhin eignet sich die TIRF-Mikroskopie sehr gut für die Abbildung von einzelnen Fluorophoren, welche sich nahe der Oberfläche des Deckglases befinden. Es lassen sich so zum Beispiel die Fluoreszenzeigenschaften (z.B. Quanteneffizienz, Bleichzeit) von Fluorophoren, welche z.B. über eine PEG-Schicht am Deckglas fixiert wurden, bestimmen. Zusammengefasst ermöglicht die TIRF-Beleuchtung also eine verbesserte Abbildung von biologischen Strukturen, dynami-

schen Prozessen und photophysikalischen Moleküleigenschaften für Proben, welche sich direkt auf dem Deckglas befinden.

Für Prozesse, die sich in einer größeren Entfernung vom Deckglas abspielen, als die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes reicht, ist die HILO-Mikroskopie optimal geeignet [Toku 08]. Hier ist der selektiv beleuchtete Bereich in axialer Richtung zwar größer als bei TIRF ($\approx 4\mu\text{m}$ im Vergleich zu $\approx 0,3\mu\text{m}$), dennoch lässt sich eine Verbesserung des Kontrastes im Vergleich zur EPI-Beleuchtung erreichen (vgl. Abschnitt 4.2.1 auf Seite 31). In Abb. 6.1 sieht man die Abbildungen der dem Deckglas zugewandten Unterseite einer Zelle deren Kernporen mit GFP markiert sind, wobei der Austrittswinkel der Laserstrahls sukzessive von 0° im ersten Bild bis zu 80° im letzten vergrößert wurde ((a)-(f)). Die Fokusebene des Objektivs liegt dabei für alle Bilder in der Ebene der Kernporen an der Unterseite der Zelle. Man erkennt deutlich den verbesserten Kontrast der Abbildung der Kernporen für größere Austrittswinkel.

Die HILO-Beleuchtung eignet sich insbesondere zur Abbildung von Prozessen im Inneren von adhären Zellen. In einem Abstand von mehr als $\approx 10\mu\text{m}$ vom Deckglas ist die Beleuchtung biologischer Proben mittels Lichtscheibenmikroskopie, bei welcher der Beleuchtungsstrahl senkrecht zur Detektionsrichtung steht, von Vorteil [Ritt 10]. Diese Methode erlaubt eine leichtere Selektion des illuminierten Bereichs, da die Position der Lichtscheibe unabhängig von der Position des Objektivs gewählt werden kann, und reduziert die Detektion von Anregungslicht auf ein Minimum. Die Lichtscheibenmikroskopie eignet sich jedoch nicht für Beobachtungen sehr nahe am Deckglas, da hier das Profil des Beleuchtungsstrahls durch Deckglas und Probenkammer gestört wird.

6.1 Bestimmung der Verweilzeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HILO-Beleuchtung dazu verwendet, Transportprozesse an den Kernporen einer HeLa-Zelle zu untersuchen. Dazu wurde selektiv der dem Deckglas zugewandte Teil der Kernmembran abgebildet. Durch die HILO-Beleuchtung wurde dabei eine deutliche Verbesserung des Kontrasts in den Abbildungen erreicht.

Der Kernporenkomplex reguliert den Austausch von Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma. Für den genauen Transportmechanismus durch die Kernpore existieren verschiedene Modelle (vgl. Abschnitt 2.1.2 auf Seite 6). Durch die Untersuchung der Dynamik von freien und substratgebundenen Transportrezeptoren können Rückschlüsse auf den Transportmechanismus gezogen werden. Die Bindungszeit von Transportrezeptoren (mit oder ohne Substrat) an der Kernpore ist dabei ein Maß für die Affinität zu den inneren Strukturen des NPC und für die Geschwindigkeit des Transports. Durch zusätzlich gewonnene Informationen über die Position

6.1 Bestimmung der Verweilzeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore

des bindenden Transportrezeptors entlang der Längsachse der Pore können Aussagen über die Verteilung der Bindungsstellen im NPC getroffen werden. Theoretisch könnte ebenfalls der komplette Transportprozess durch die Pore verfolgt werden, dies ist jedoch nur möglich, wenn die Photonenausbeute des betrachteten Moleküls ausreichend groß ist, so dass die Lokalisierungsgenauigkeit deutlich kleiner wird als die Dimension der Kernpore. In der Praxis ist die Abbildung der gesamten Translokation nur für sehr wenige Bindungsereignisse möglich.

6.1.1 Untersuchte Transportprozesse

Zur Bestimmung der Bindungszeiten an der Kernpore wurden drei verschiedene Transportprozesse untersucht:

- Der Transport von NTF2 durch die Kernpore in den Zellkern im freien Zustand, und gebunden an das Substrat RanGDP
- Der Import von GST, welches mit einer NLS-Sequenz versehen wurde, durch die Transportrezeptoren Importin- α und Importin- β 1
- Der Transport des Proteins M3 in den Zellkern durch den Rezeptor Importin- β 2 (Transportin)

Dazu wurden die Zellen permeabilisiert und ein Transportgemisch beigegeben, welches die jeweiligen Transportkomplexe enthält (vgl. [Babc 04, Yang 04]). Um die nötige Energie für die Transportprozesse bereitzustellen, wurde dem Gemisch jeweils ein Überschuss ATP und GTP beigelegt. Für alle Experimente wurde eine stabil transfizierte HeLa-Zelllinie verwendet, die fluoreszierende Kernporen aufweist. Dies wird durch Konjugation von GFP an das Nukleoporin POM-121 erreicht [Bodo 99]. Für jeden Transportprozess wurden ca. 15 Zellen untersucht, pro Zelle wurden durchschnittlich 20 Kernporen analysiert.

6.1.2 Bestimmung der mittleren Bindungszeiten

Zur Bestimmung der mittleren Bindungszeiten wurden HeLa-Zellen permeabilisiert und ein Transportgemisch beigegeben, welches die zu untersuchenden Transportrezeptoren und Substrate enthält. Unter HILO-Beleuchtung wurden dann Bilder der Transportrezeptoren an den Positionen der Kernporen aufgenommen (siehe Abschnitt 5.2). In Abb. 6.2 ist beispielhaft ein Übersichtsbild der mit GFP markierten Kernporen, sowie Bilder eines an eine Kernpore bindenden Transportrezeptors Imp β 1 dargestellt. Man erkennt eine leichte Verzerrung der Bilder des Transportrezeptors, welche durch die in den Detektionsstrahlengang eingefügte Zylinderlinse hervorgerufen wurde. Aus den so erhaltenen Bildstapeln wurden die Bindungsereignisse selektiert

(siehe Abschnitt 5.3) aus welchen nun die Bindungszeiten der freien bzw. substratgebundenen Transportrezeptoren an der Pore ermittelt werden.

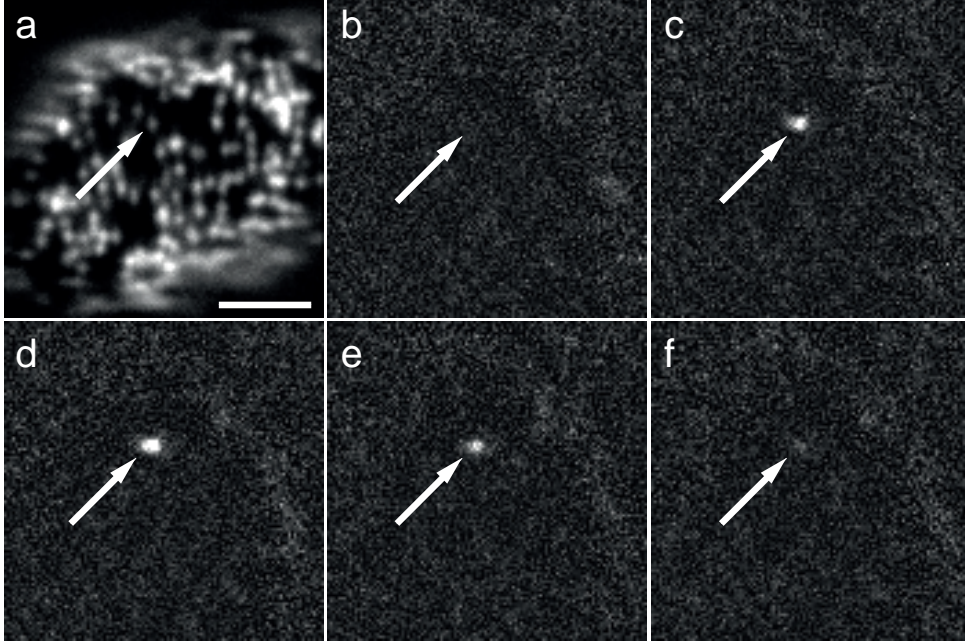


Abbildung 6.2: (a) Übersichtsbild der GFP-markierten Kernporen an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns. (b)-(f) Impβ1 bindet an die Kernpore. Balken = 2,5µm.

Dazu wird die Verteilung der Bindungszeiten aufgetragen, wobei die Bindungszeit der Ereignislänge (Bildzahl) multipliziert mit der Belichtungszeit der Kamera $t_{exp} = 2,1ms$ entspricht (hier ist bereits die Auslesezeit der Kamera berücksichtigt). Es zeigt sich, dass überproportional viele Bindungsereignisse nur in einem Bild zu sehen sind (siehe Abb. 6.3).

Eine mögliche Erklärung für die hohe Anzahl der kurzen Ereignisse ist, dass es sich hierbei nicht um die tatsächliche Bindung eines Transportrezeptors an die Kernpore handelt, sondern um die zufällige Detektion eines Rezeptors welcher sich zwar an der x/y-Position der Kernpore befindet, allerdings ober- oder unterhalb der Pore. Aufgrund der hohen Beleuchtungsintensität von ca. $45 \frac{kW}{cm^2}$ wird dieser trotz Abstand zur Fokusebene noch gut abgebildet.

Im folgenden wird daher ein Ereignis nur als Bindungsereignis gewertet, wenn es für mindestens zwei aufeinanderfolgende Bilder an der Kernpore zu sehen ist, um die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen, falsch-positiven Beobachtung zu reduzieren. Für die Anpassung der Bindungszeitverteilung mit einer einfachen Exponentialfunktion wird die erste Klasse also nicht miteinbezogen. Da es sich um eine Exponentialverteilung handelt, ergibt sich dennoch der korrekte Mittelwert τ für die Bindungszeit, unter der Annahme, dass die Anzahl der realen Bindungsereignisse in der ersten Klasse weiter der Exponentialverteilung entspricht.

Alle Bindungszeitverteilungen der untersuchten Transportrezeptoren/komplexe zeigen einen

6.1 Bestimmung der Verweilzeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore

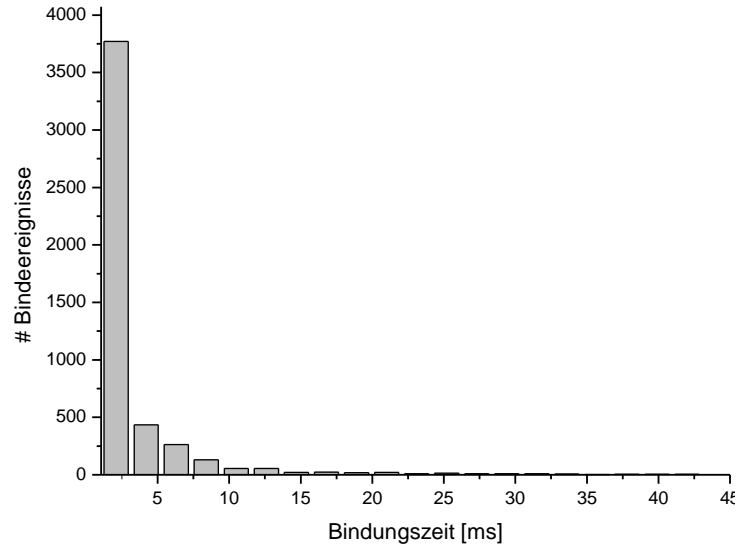


Abbildung 6.3: Bindungszeitverteilung der Transportrezeptors NTF2 (mit Schwellenwertfaktor $n=8$).

exponentiellen Verlauf (vgl. z.B. [Tu 11], [Dang 08], [Kubi 05]). An diesen wurde jeweils eine gewichtete einfache Exponentialfunktion angepasst (siehe Abb. 6.4).

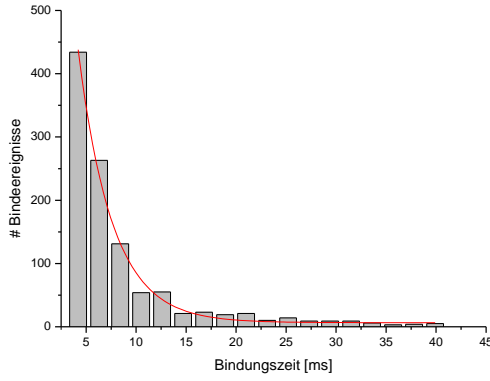
$$f(t) = y_0 + Ae^{-\frac{t}{\tau}} \quad (6.1)$$

Die Zeit τ , welche die Zeit angibt, nach der sich nur noch der $\frac{1}{e}$ -te Teil der bindenden Partikel an der Pore befindet, ist die mittlere Bindungszeit.

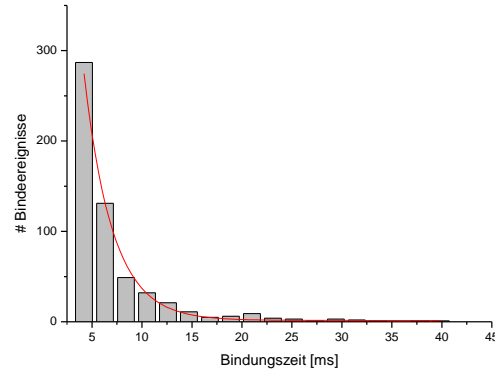
6.1.3 Einfluss des Schwellenwertfaktors auf die Ergebnisse

Bei der Selektion der Bindungsereignisse wurde eine Mindestgröße der mittleren Intensität eines bindenden Transportrezeptors festgelegt. Diese setzt sich zusammen aus dem mittleren Untergrundsignal und einem vielfachen der Standardabweichung des Untergrundsignals (siehe Gl. 5.2 in Abschnitt 5.3.1). Die Größe des Schwellenwertfaktors n ist dabei nicht zwingend vorgegeben. Es ist zu erwarten, dass dieser einen Einfluss auf die Anzahl und Länge der erfassten Bindungsereignisse hat, und damit auch auf die resultierende mittlere Bindungszeit. Für die hier untersuchten Bindungsereignisse wurden daher 6 verschiedene Schwellenwertfaktoren ($n = 5..10$) verwendet und der Einfluss auf die Anzahl der Bindungsereignisse und die mittlere Bindungszeit untersucht.

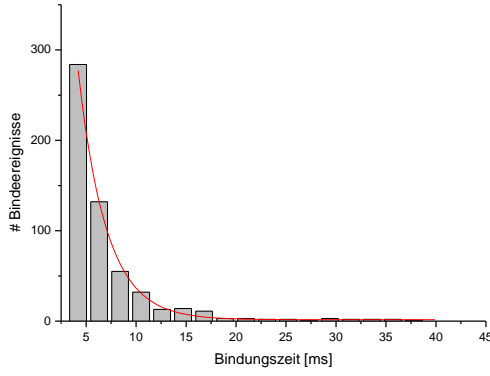
Ein hoher Schwellenwertfaktor n führt zur Selektion von besonders „signalintensiven“ Ereignissen welche gut mit einer 2D-Gaußfunktion (siehe Gl. 5.3 in Abschnitt 5.3.2) angepasst werden können. Daraus ergibt sich dementsprechend ein höherer Wert für die Anpassungsgüte R^2 (siehe



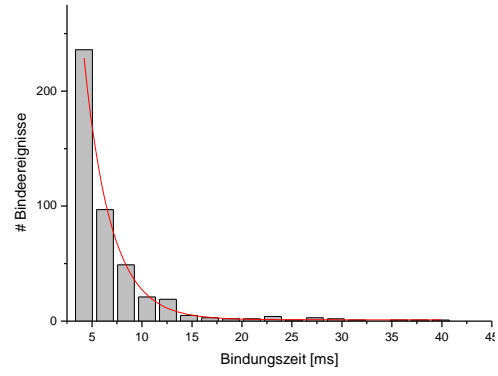
(a) Bindungszeitverteilung für NTF2, $\tau=3,4\pm0,2\text{ms}$.



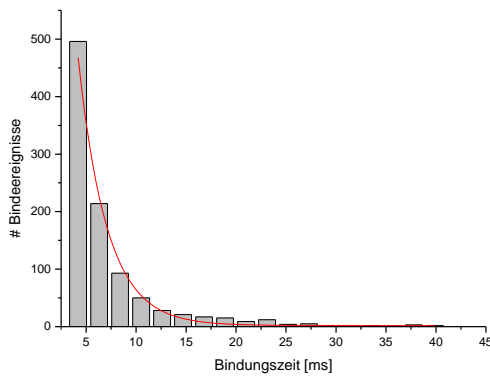
(b) Bindungszeitverteilung für NTF2 + RanGDP, $\tau=2,8\pm0,2\text{ms}$.



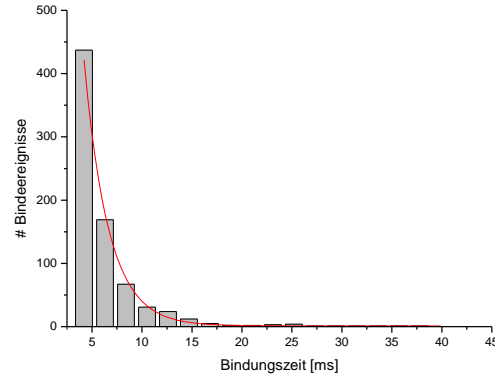
(c) Bindungszeitverteilung für Impβ1, $\tau=2,8\pm0,1\text{ms}$.



(d) Bindungszeitverteilung für Impβ1 + GST-NLS, $\tau=2,7\pm0,1\text{ms}$.



(e) Bindungszeitverteilung für Impβ2, $\tau=2,9\pm0,2\text{ms}$.

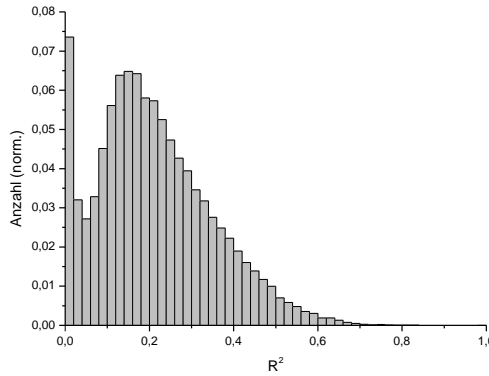


(f) Bindungszeitverteilung für Impβ2 + M3, $\tau=2,4\pm0,1\text{ms}$.

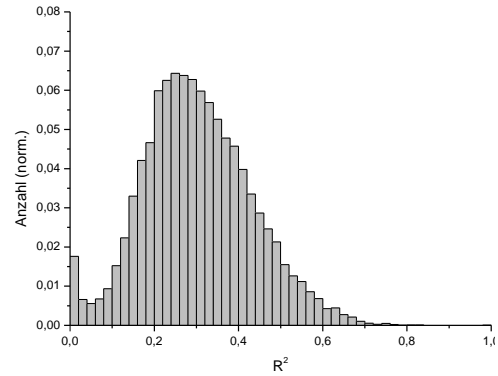
Abbildung 6.4: Verteilungen der Bindungszeiten der unterschiedlichen Transportrezeptoren für den Schwellenwertfaktor $n=8$ mit angepassten Exponentialfunktionen.

6.1 Bestimmung der Verweilzeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore

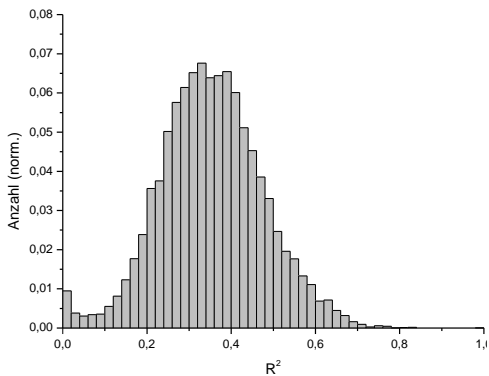
Gl. 5.4). In den Abbildungen 6.5a, 6.5b und 6.5c sind die Verteilungen der Werte für R^2 für die Schwellenwertfaktoren $n=5$, $n=8$ und $n=10$ dargestellt (für den Transportrezeptor NTF2). Man erkennt die deutliche Verschiebung hin zu höheren Werten für größere n . Die Standardfehler der Standardabweichungen in x und y , Δw_x und Δw_y (vgl. Abschnitt 4.3.1 auf Seite 39), sind dabei kleiner als eine Pixelbreite ($=60\text{nm}$).



(a) Verteilung der Anpassungsgüte R^2 für $n=5$.



(b) Verteilung der Anpassungsgüte R^2 für $n=8$.



(c) Verteilung der Anpassungsgüte R^2 für $n=10$.

Abbildung 6.5: Verteilungen der Anpassungsgüte R^2 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n . Für höhere Schwellenwertfaktoren verschiebt sich das Maximum der Verteilung hin zu höheren Werten für R^2 .

Betrachtet man die Gesamtanzahl der Bindungsereignisse, welche die übrigen Kriterien (vgl. Abschnitt 5.3.3) erfüllen in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n , zeigt sich, dass diese am größten ist für Werte zwischen $n=7$ und $n=9$ (siehe Abb. 6.6). Zunächst würde man erwarten, dass die Gesamtanzahl für den kleinsten Schwellenwertfaktor von $n=5$ maximal wird, da auch die Anzahl der vorläufigen Ereignisse maximal wird. Durch die weitere Selektion mittels der

Anpassungsgüte R^2 werden aber viele dieser vorläufigen Ereignisse wieder verworfen, da gerade Ereignisse mit einer nur geringfügig höheren Intensität als der Hintergrund nur schlecht mit einer 2D-Gaußfunktion angepasst werden können. Für große n sind die Anpassungsgüten der 2D-Gaußfunktionen größer, allerdings sinkt die Anzahl der vorläufigen Ereignisse erheblich.

Die mittlere Bindungszeit, die aus der Verteilung der Bindungszeiten ermittelt wird, variiert ebenfalls mit der Größe des Schwellenwertfaktors n . Die mittlere Bindungszeit steigt dabei nahezu monoton mit dem Schwellenwertfaktor an (siehe Abb. 6.7). Wiederum würde man erwarten, dass für kleine n die mittlere Bindungszeit steigt, da z.B. Ereignisse deren Intensität im ersten oder letzten Bild noch unter dem Schwellenwert für ein größeres n liegen, als längeres Ereignis erscheinen. Durch die Bedingung an die Anpassungsgüte R^2 werden diese Ereignisse aber häufiger verworfen. Für große n ist ein größerer Werte für R^2 wahrscheinlicher und ein Ereignis wird somit als Bindungsereignis gewertet.

6.2 Bindungszeiten der Transportrezeptoren an der Kernpore

Die Bindungszeiten der Transportrezeptoren wurden für unterschiedliche Schwellenwertfaktoren n untersucht. Es zeigt sich, dass unterschiedliche Schwellenwertfaktoren zwar in unterschiedlichen absoluten mittleren Bindungszeiten resultieren, relative Unterschiede zwischen freien und substratgebundenen Rezeptoren aber für alle n erhalten bleiben. In Tabelle 6.1 sind die mittleren Bindungszeiten aller untersuchten Transportkomplexe für den Schwellenwertfaktor $n=8$ dargestellt.

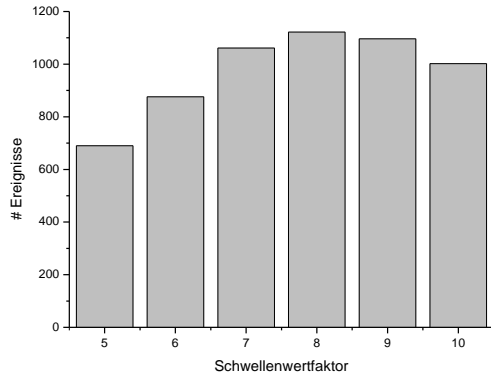
NTF2

Für den Transportrezeptor NTF2 und das Substrat RanGDP ergibt sich für den substratgebundenen Zustand eine kürzere Bindungszeit an die Kernpore als für den freien Rezeptor. Dies gilt für alle gewählten Schwellenwertfaktoren n (siehe Abb. 6.7a). Die Werte für die Bindungszeit des Transportkomplexes liegen durchschnittlich um $20 \pm 5\%$ unter den Werten des freien Transportrezeptors.

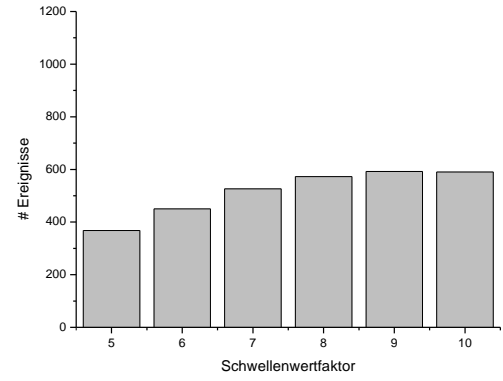
Imp β 1

Für den Transportrezeptor Imp β 1 und das Substrat GST-NLS unterscheiden sich die mittleren Bindungszeiten für alle Schwellenwertfaktoren kaum, wobei sich die Fehlergrenzen überlappen (siehe Abb. 6.7b). Ein Unterschied in der Bindungszeit zwischen freiem und substratgebundenem Transportrezeptor lässt sich hier nicht feststellen.

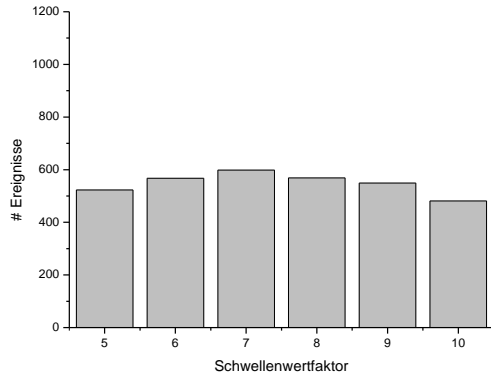
6.2 Bindungszeiten der Transportrezeptoren an der Kernpore



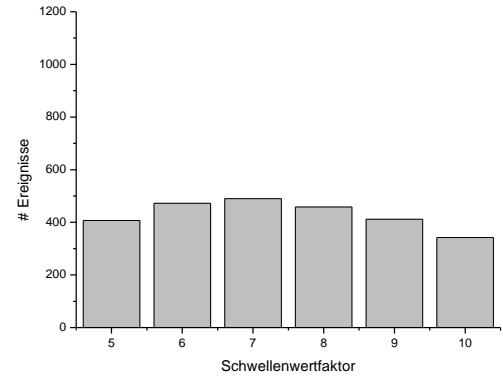
(a) Anzahl der Bindungsereignisse von NTF2 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .



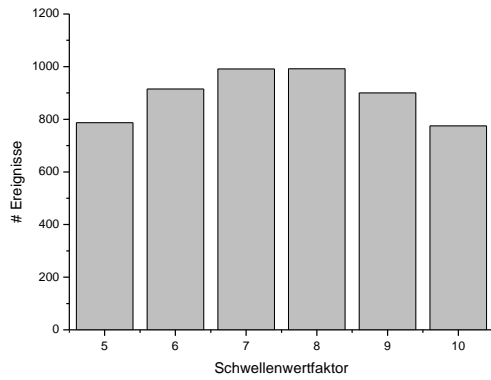
(b) Anzahl der Bindungsereignisse von NTF2 + RanGDP für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .



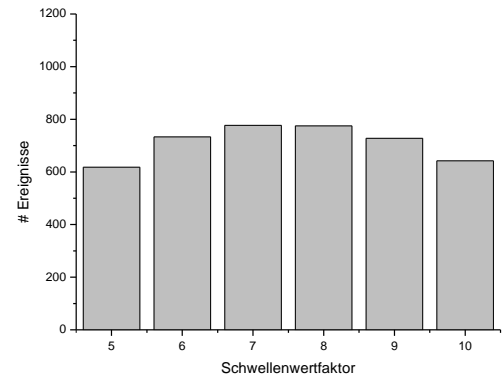
(c) Anzahl der Bindungsereignisse von Impβ1 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .



(d) Anzahl der Bindungsereignisse von Impβ1 + GST-NLS für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .

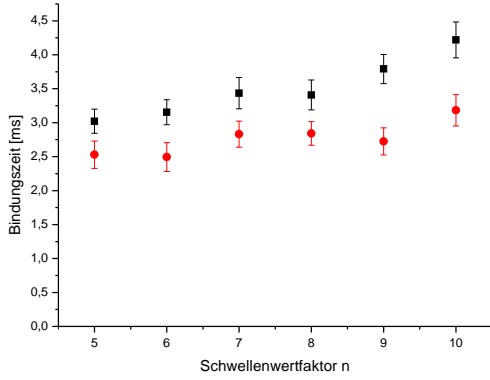


(e) Anzahl der Bindungsereignisse von Impβ2 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .

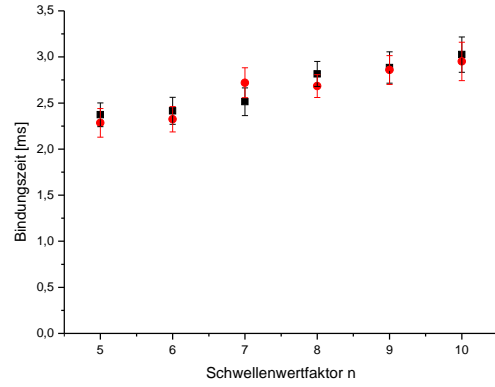


(f) Anzahl der Bindungsereignisse von Impβ2 + M3 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n .

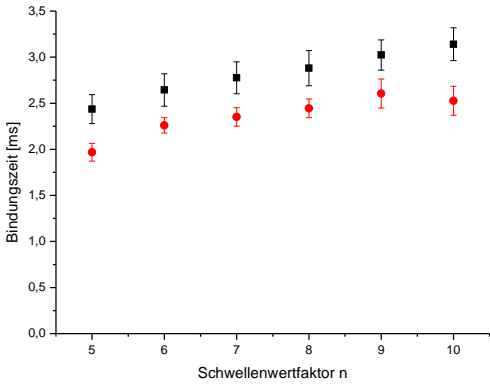
Abbildung 6.6: Anzahl der Bindungsereignisse in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n . Das Maximum der Anzahl der Bindungsereignisse liegt bei einem Schwellenwertfaktor $7 \leq n \leq 9$.



(a) Bindungszeiten der substratgebundenen (rot) und freien (schwarz) NTF2 in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n . Für alle n gilt $\tau_{gebunden} < \tau_{frei}$.



(b) Bindungszeiten der substratgebundenen (rot) und freien (schwarz) Impβ1 in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n . Die Werte für $\tau_{gebunden}$ und τ_{frei} liegen innerhalb ihrer jeweiligen Fehlergrenzen.



(c) Bindungszeiten der substratgebundenen (rot) und freien (schwarz) Impβ2 in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n . Für alle n gilt $\tau_{gebunden} < \tau_{frei}$.

Abbildung 6.7: Mittlere Bindungszeit der Transportrezeptoren/komplexe für verschiedene Schwellenwertfaktoren n . Für NTF2 und Impβ2 sind deutliche Unterschiede für die τ_{frei} und substratgebundener Transportrezeptoren zu erkennen.

6.3 Lokalisierungsgenauigkeit der Transportrezeptoren

Impß2

Für den Transportrezeptor Impß2 und das Substrat M3-GST ergibt sich für den substratgebundenen Zustand ebenfalls eine kürzere Bindungszeit an die Kernpore als für den freien. Dies gilt wieder für alle gewählten Schwellenwertfaktoren n (siehe Abb. 6.7c). Die Werte für die Bindungszeit des Transportkomplexes liegen durchschnittlich um $16 \pm 2\%$ unter den Werten des freien Transportrezeptors.

6.3 Lokalisierungsgenauigkeit der Transportrezeptoren

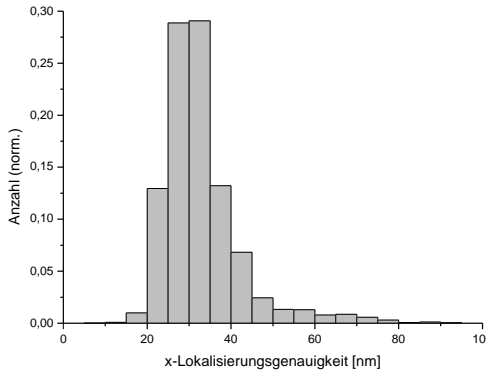
Zusätzlich zur Bindungszeit der Transportrezeptoren an der Kernpore wird deren Position relativ zum Kernporenzentrum bestimmt. Zur Bestimmung des Zentrums werden wieder die Bilder der GFP-Nukleoporine verwendet. Um die genaue Lage des Zentrums zu bestimmen, muss die Anordnung der Nukleoporine in der Kernpore berücksichtigt werden. Die POM-121 Nukleoporine befinden sich in einer achtfachen Symmetrie um die Achse durch den Mittelpunkt des inneren Kanals der Kernpore [Sode 97]. Der Abstand zur Achse beträgt ca. 30nm. Die sich überlagernden Beugungsscheibchen der 8 GFPs werden mit einer 2D-Gaußfunktion angepasst und daraus die Position der Pore in x- und y-Richtung bestimmt. Bleicht eines oder mehrere der GFPs, kann dies zu einer Verschiebung des gemessenen Kernporenzentrums relativ zum wahren Zentrum führen. In der Auswertung wird daher nur das erste Bild der Kernporen zur Bestimmung der Position verwendet, unter der Annahme, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine GFP-Moleküle geblichen waren. Zur Bestimmung der relativen Positionen wird zunächst die Lokalisierungsgenauigkeit einzelner Transportrezeptoren in lateraler und axialer Richtung bestimmt.

6.3.1 Lokalisierungsgenauigkeit in lateraler Richtung

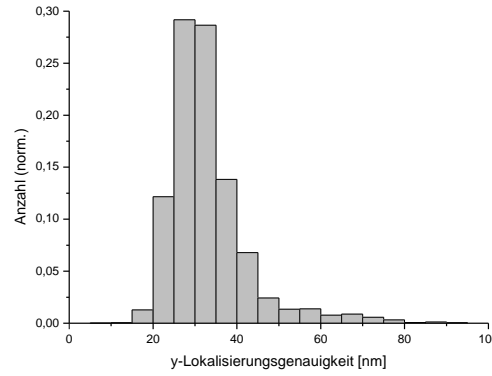
Zur Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit in lateraler Richtung wird für jedes Bild eines bindenden Rezeptors und der zugehörigen Kernpore die Anzahl der detektierten Photonen innerhalb des 7x7 Pixel Bildbereichs um das Porenzentrum bestimmt. Daraus lässt sich die Lokalisierungsgenauigkeit in x- bzw. y-Richtung abschätzen (nach [Thom 02]):

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (6.2)$$

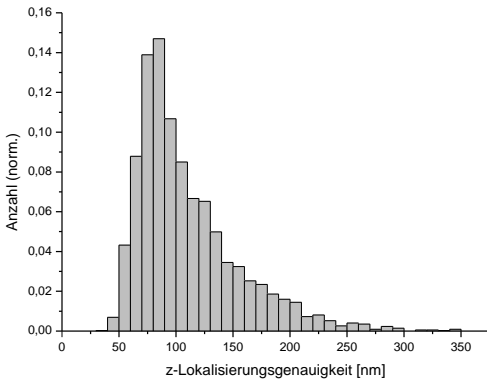
Hier ist s die Standardabweichung der angepassten Gaußfunktion, a die effektive Kantenlänge eines Pixels ($a=60\text{nm}$), N die Anzahl der detektierten Photonen und b die Standardabweichung des Hintergrundsignals. Letztere wurde aus den Daten der Intensitätszeitreihe an der Pore bestimmt. Die so berechnete Lokalisierungsgenauigkeit nimmt unterschiedliche Werte an, da für je-



(a) Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten der Transportrezeptoren in x-Richtung. Die mittlere Lokalisierungsgenauigkeit beträgt $\langle x \rangle = 33\text{nm} \pm 10\text{nm}$.



(b) Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten der Transportrezeptoren in y-Richtung. Die mittlere Lokalisierungsgenauigkeit beträgt $\langle y \rangle = 33\text{nm} \pm 10\text{nm}$.



(c) Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten der Transportrezeptoren in z-Richtung. Die mittlere Lokalisierungsgenauigkeit beträgt $\langle z \rangle = 120\text{nm} \pm 87\text{nm}$.

Abbildung 6.8: Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten der Transportrezeptoren in den drei Raumrichtungen.

6.4 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren

des Signal eines Transportrezeptors eine unterschiedlich große Anzahl Photonen detektiert wird. Die Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten in x- und y-Richtung ist in den Abbildungen 6.8a und 6.8b dargestellt. Die mittlere Lokalisierungsgenauigkeit beträgt sowohl in x- als auch in y-Richtung $\Delta x = \Delta y = 33\text{nm} \pm 10\text{nm}$. Die Genauigkeit ist hinreichend klein im Vergleich zur Ausdehnung der Kernpore von ca. 125nm im Durchmesser, um Aussagen über die relativen lateralen Positionen von bindenden Transportrezeptoren zum Zentrum der Kernpore machen zu können.

6.3.2 Lokalisierungsgenauigkeit in axialer Richtung

Zur Bestimmung der axialen Lokalisierungsgenauigkeit von Transportrezeptoren wird an jedes Bild eine elliptische 2D-Gaußfunktion angepasst. Aus den Anpassungs-Fehlern der Standardabweichungen in x- und y-Richtung wird dann die Lokalisierungsgenauigkeit ermittelt (vgl. Abschnitt 4.3.2 auf Seite 43 und Gl. 4.7). Für jedes Bild bindender Transportrezeptoren ergeben sich somit wieder unterschiedliche Lokalisierungsgenauigkeiten in axialer Richtung. Die Verteilung der Δz ist in Abb. 6.8c dargestellt. Die mittlere Lokalisierungsgenauigkeit beträgt $\Delta z = 120\text{nm} \pm 87\text{nm}$ mit einem Maximum der Verteilung bei $\approx 90\text{nm}$. Die axiale Lokalisierungsgenauigkeit ist sehr groß im Vergleich zur Ausdehnung der Kernpore, deren innerer Kanal eine Länge von ungefähr 70nm hat (unter Berücksichtigung der zyto- und nukleoplasmatischen Filamente vergrößert sich die Ausdehnung in axialer Richtung auf 150-200nm). Es können daher nur sehr eingeschränkte Aussagen über die relativen axialen Positionen eines bindenden Transportrezeptors getroffen werden.

Korrelation zwischen R^2 und Δz

Die axiale Lokalisierungsgenauigkeit berechnet sich aus den Standardfehlern der Standardabweichungen w_x und w_y (siehe Gl. 4.5). Ebenso beeinflusst die Güte der Anpassung der 2D-Gaußfunktion die Größe des Bestimmtheitsmaßes R^2 . In Abbildung 6.9 ist diese Korrelation zwischen der Anpassungsgüte R^2 und der Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung dargestellt. Wie erwartet wird für hohe Werte für R^2 eine hohe Lokalisierungsgenauigkeit erreicht.

6.4 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren

Die HILO-Beleuchtung ermöglicht eine besonders kontrastreiche Abbildung der Kernporen an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns. Daher kann man durch Anpassen von 2D-Gaußfunktionen an die Bilder der Transportrezeptoren und Kernporen direkt deren lateralen Abstand zueinander bestimmen. Durch die Verwendung einer Zylinderlinse werden weiterhin Informationen über den Abstand entlang der optischen Achse (z-Richtung) erlangt. Im folgenden

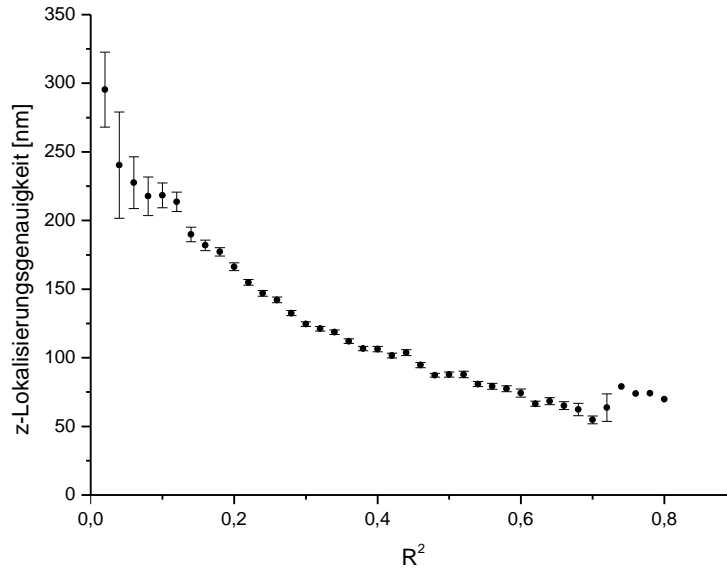


Abbildung 6.9: Korrelation zwischen der Anpassungsgüte R^2 und der Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung. Die einzelnen Datenpunkte sind jeweils die Mittelwerte aller Lokalisierungsgenauigkeiten in z-Richtung für einen bestimmten Bereich der Anpassungsgüte.

werden die radialen und axialen Verteilungen der bindenden Transportrezeptoren in Bezug auf die Kernporenkomplexe analysiert.

6.4.1 Radiale Verteilung bindender Transportrezeptoren

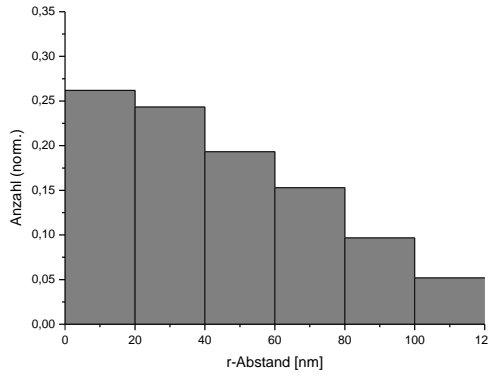
Zur Bestimmung der radialen Verteilung der Transportrezeptoren in Bezug auf das Zentrum der Kernpore wurde für jedes zugehörige Paar aus Kernpore und Rezeptor die x- und y-Positionen bestimmt und daraus der radiale Abstand berechnet. Der Fehler des Abstands berechnet sich aus den Lokalisierungsgenauigkeiten für Kernpore und Rezeptor zu $\sigma_r = \sqrt{\sigma_{NPC}^2 + \sigma_{TR}^2}$. Die Verteilung der radialen Abstände für einen bestimmten Transportrezeptor/Transportkomplex wurde durch die Fläche des zugehörigen Kreisrings dividiert um die radiale Verteilungsfunktion zu erhalten. Da die radialen Abstände als Histogramm dargestellt werden, werden die zugehörigen Kreisringflächen diskret für jede Klasse (*Bin*) berechnet. Es gilt für die Fläche:

$$A = \pi(r + b)^2 - \pi r^2 \quad (6.3)$$

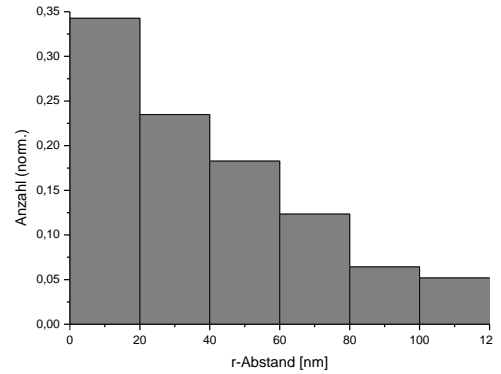
$$= 2\pi br + b^2 r \quad (6.4)$$

Hier bezeichnet r den kleinsten Wert einer Klasse und b die Klassenbreite. Die radialen Abstandsverteilungen für die 6 unterschiedlichen Transportrezeptoren/Transportkomplexe sind in den Abbildungen 6.10a bis 6.10f dargestellt.

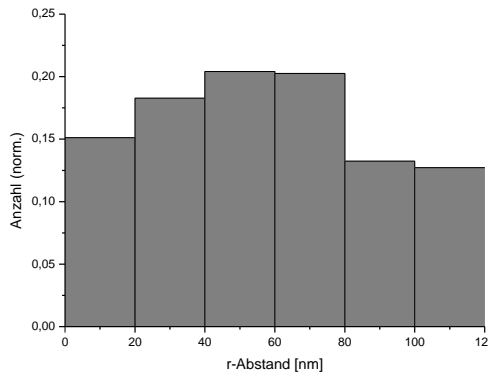
6.4 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren



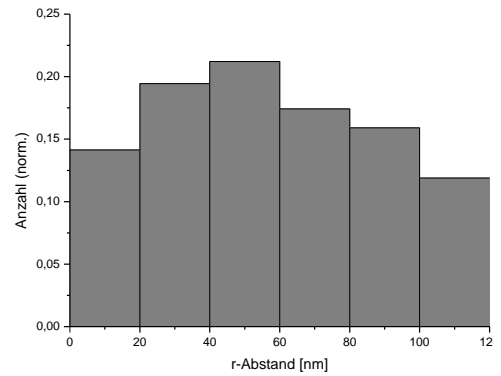
(a) Verteilung des radialen Abstands des Transportrezeptors NTF2 relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 45\text{nm}$.



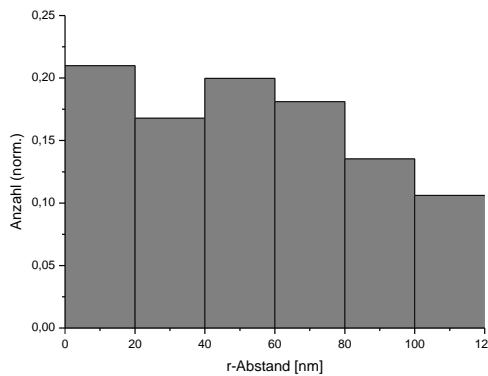
(b) Verteilung des radialen Abstands des Transportkomplexes NTF2 + RanGDP relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 40\text{nm}$.



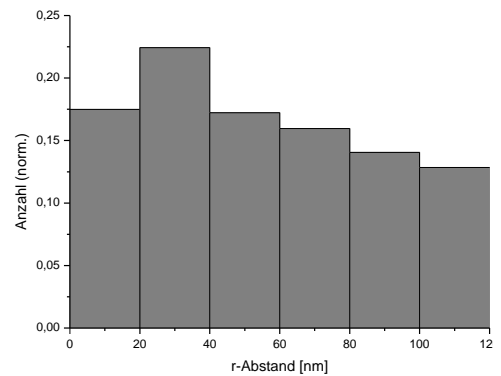
(c) Verteilung des radialen Abstands des Transportrezeptors Impβ1 relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 58\text{nm}$.



(d) Verteilung des radialen Abstands des Transportkomplexes Impβ1 + GST-NLS relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 58\text{nm}$.



(e) Verteilung des radialen Abstands des Transportrezeptors Impβ2 relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 54\text{nm}$.



(f) Verteilung des radialen Abstands des Transportkomplexes Impβ2 + M3 relativ zum Zentrum der Kernpore. Der mittlere Abstand ist $\langle r \rangle \approx 55\text{nm}$.

Abbildung 6.10: Verteilungen der radialen Abstände verschiedener Transportrezeptoren in Relation zum Zentrum der Kernpore.

Für den freien und substratgebundenen Transportrezeptor NTF2 zeigt sich dabei eine deutliche Häufung der Bindungsstellen hin zum Zentrum der Pore (siehe 6.10a und 6.10b). Aber auch in größerem Abstand vom Porenzentrum sind die Rezeptoren zu beobachten. Zu beachten ist hierbei, dass ein Transportrezeptor während des gesamten Bindungsvorgangs abgebildet wird. Das heißt, dass die laterale Position auch von sich an die Kernpore annähernden Rezeptoren gemessen wird (solange die Bedingungen für Intensität und Anpassungsgüte erfüllt sind), bevor der eigentliche Transport durch den Porenkanal stattfindet. Ebenso werden Bindungsereignisse registriert welche nicht zu einem Transport durch die Pore führen, sowie mögliche unspezifische Bindungen in der Umgebung der Pore. Der relative mittlere Abstand zum Porenzentrum beträgt $\approx 45\text{nm}$ für den freien und $\approx 40\text{nm}$ für den substratgebundenen Rezeptor.

Der Transportrezeptor Imp β 1 zeigt im freien sowie substratgebundenen Zustand eine Häufung in einem Abstand zwischen 40nm und 60nm vom Porenzentrum (siehe 6.10c und 6.10d). Der relative mittlere Abstand zum Porenzentrum beträgt $\approx 58\text{nm}$ für den freien sowie den substratgebundenen Rezeptor.

Der freie Transportrezeptor Imp β 2 zeigt wieder eine etwas größere Häufung zum Porenzentrum mit einem mittleren Abstand von $\approx 54\text{nm}$ (siehe 6.10e). Der substratgebundene Rezeptor besitzt eine Häufung im Abstand zwischen 20nm und 40nm mit einem mittleren Abstand von $\approx 55\text{nm}$ (siehe 6.10f).

6.4.2 Axiale Verteilung bindender Transportrezeptoren

Durch die Einbringung einer schwach fokussierenden Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang verändert sich die Punktspreizfunktion der abgebildeten Transportrezeptoren und man erhält eine Information über die z-Position relativ zur Kernpore (vgl. Abschnitt 4.3). Dazu werden die aus den Anpassungen der 2D-Gaußfunktion ermittelten Werte für die Breite in x- und y-Richtung in die in Abschnitt 4.3.3 hergeleitete Formel für den relativen Abstand zwischen zwei Fluorophoren eingesetzt:

$$(z_1 - z_2) = \frac{\frac{w_{1x}}{w_{1y}} - 1}{m_1} - \frac{\frac{w_{2x}}{w_{2y}} - 1}{m_2} + \Delta z_{chrom} \quad (6.5)$$

Daraus ergeben sich für jedes Bindungsereignis in jedem Bild eine relative z-Position zur Kernpore. Für den Fehler der relativen z-Position gilt Gl. 4.9. Für die verschiedenen Transportrezeptoren wurde nun die Verteilung der Abstände zur Pore ermittelt (siehe Abb. 6.11). In diesen Darstellungen der Verteilungen zeigen negative z-Werte Positionen im Zytoplasma an, positive z-Werte Positionen im Zellkern. Die Mittelwerte der Verteilungen, sowie deren Breiten sind in Tab. 6.1 aufgeführt.

6.4 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren

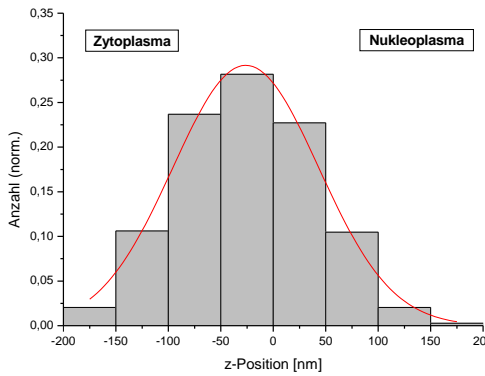
Transportkomplex	Bindungszeit [ms]	x_c [nm]	FWHM [nm]	Anzahl Ereignisse
NTF2	$3,4 \pm 0,2$	-26 ± 2	164 ± 4	1122
NTF2 + RanGDP	$2,8 \pm 0,2$	-24 ± 3	142 ± 6	573
Imp β 1	$2,8 \pm 0,1$	5 ± 6	165 ± 14	569
Imp β 1 + GST-NLS	$2,7 \pm 0,1$	-13 ± 3	156 ± 7	458
Imp β 2	$2,9 \pm 0,2$	-10 ± 3	168 ± 7	992
Imp β 2 + M3-GST	$2,4 \pm 0,1$	20 ± 4	174 ± 10	775

Tabelle 6.1: Bindungszeiten und Bindungspositionsverteilung der verschiedenen Transportrezeptoren/komplexe für den Schwellenwertfaktor $n=8$. Negative Werte für das Zentrum x_c der Bindungspositionsverteilung liegen im Zytoplasma, positive im Zellkern.

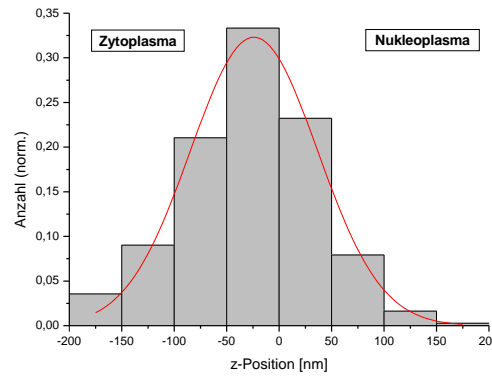
Der Transportrezeptor NTF2 zeigt sowohl im freien als auch im substratgebundenen Zustand eine Häufung von detektierten z-Positionen auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran. Der freie Rezeptor NTF2 liegt zu 65% im Zytoplasma und zu 35% im Nukleoplasma. Der Transportkomplex NTF2+RanGDP liegt zu 67% im Zytoplasma und zu 33% im Nukleoplasma. Die mittlere z-Position beträgt $z=-26\text{nm} \pm 2\text{nm}$ bzw. $z=-24\text{nm} \pm 3\text{nm}$. Beide Verteilungen haben ihre größte Häufung in einem Abstand zwischen 0nm und 50nm von der Kernpore auf der zytoplasmatischen Seite.

Für den Transportrezeptor Imp β 1 ergibt sich eine unterschiedliche Verteilung für den freien bzw. substratgebundenen Zustand, mit einer Häufung im Zytoplasma für den substratgebundenen Rezeptor. Der freie Rezeptor Imp β 1 liegt zu 49% im Zytoplasma und zu 51% im Nukleoplasma, mit einer mittleren z-Position von $z=5\text{nm} \pm 6\text{nm}$. Die größte Häufung befindet sich im Abstand von 0-50nm auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran. Der Transportkomplex Imp β 1+Imp α 1+GST-NLS liegt zu 59% im Zytoplasma und zu 41% im Nukleoplasma, mit einer mittleren z-Position von $z=-13\text{nm} \pm 3\text{nm}$. Hier befindet sich die größte Häufung im Abstand von 0-50nm auf der zytoplasmatischen Seite.

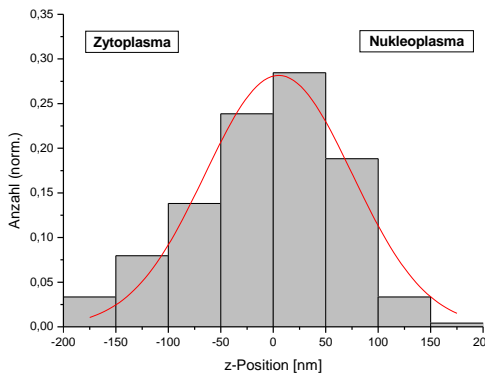
Der Transportrezeptor Imp β 2 hat ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung für den freien bzw. substratgebundenen Zustand. Hier aber mit einer Häufung im Nukleoplasma für den substratgebundenen Rezeptor. Der freie Rezeptor Imp β 2 liegt zu 55% im Zytoplasma und zu 45% im Nukleoplasma, mit einer mittleren z-Position von $z=-10\text{nm} \pm 3\text{nm}$. Die größte Häufung befindet sich im Abstand von 0-50nm auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran. Der Transportkomplex Imp β 1+Imp α 1+GST-NLS liegt zu 40% im Zytoplasma und zu 60% im Nukleoplasma, mit einer mittleren z-Position von $z=20\text{nm} \pm 4\text{nm}$. Hier befindet sich die größte Häufung im Abstand von 0-50nm auf der nukleoplasmatischen Seite.



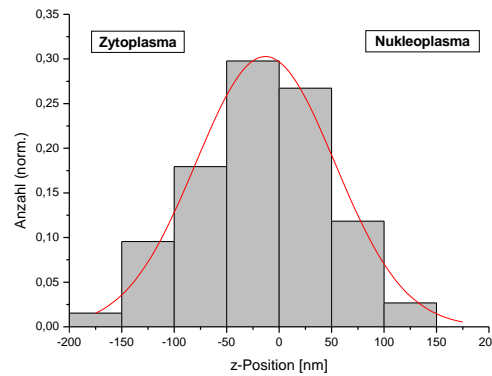
(a) Verteilung der z-Positionen des Transportrezeptors NTF2 relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = -26 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.



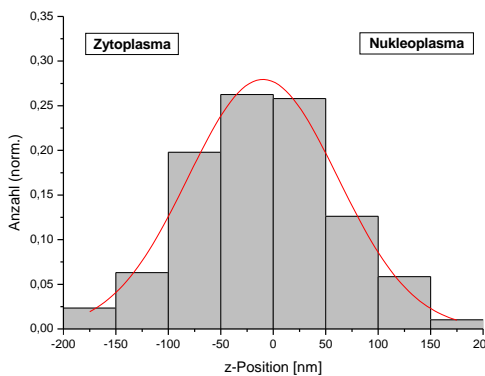
(b) Verteilung der z-Positionen des Transportkomplexes NTF2 + RanGDP relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = -24 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.



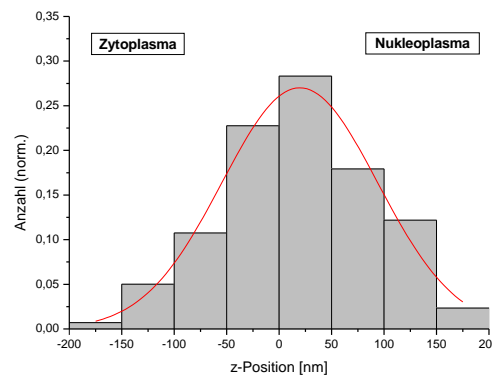
(c) Verteilung der z-Positionen des Transportrezeptors Impβ1 relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = 5 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$.



(d) Verteilung der z-Positionen des Transportkomplexes Impβ1 + GST-NLS relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = -13 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.



(e) Verteilung der z-Positionen des Transportrezeptors Impβ2 relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = -10 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.



(f) Verteilung der z-Positionen des Transportkomplexes Impβ2 + M3 relativ zum Zentrum der Kernpore. Die mittlere z-Position beträgt $z = 20 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$.

Abbildung 6.11: Verteilungen der z-Positionen verschiedener Transportrezeptoren in Relation zum Zentrum der Kernpore.

7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie Prozesse im Inneren von Zellen untersucht. Der Austausch von Proteinen mit einer Masse größer als 40kDa zwischen Zellkern und Zytoplasma findet durch die Kernporen statt [Pant 02]. Der Transportmechanismus durch die Kernpore ist Gegenstand der aktuellen Forschung und wurde anhand der Bindungszeiten von Transportrezeptoren an der Kernpore analysiert.

Das Verhalten verschiedener Transportrezeptoren einzeln und in einem Transportkomplex mit einem durch die Kernpore zu transportierenden Substrat an einer Kernpore wurde auf Einzelmolekülebene untersucht. Im Gegensatz zu bisherigen Studien wurden hier die Kernporen an der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns betrachtet, im Gegensatz zur Abbildung der Äquatorregion des Zellkerns. Dadurch konnten einzelne Kernporen klar differenziert werden, da hier nicht die Unsicherheit auftritt, ob mehrere in Beobachtungsrichtung hintereinanderliegende Kernporen zusammen abgebildet werden. Zusätzlich wurde zur Kontrastverbesserung eine HILO-Beleuchtung verwendet, wodurch abgebildete Kernporen und Transportrezeptoren sich besser vom Untergrundsignal unterscheiden ließen. Um auch Aussagen über die z-Position (entlang der Beobachtungsrichtung durch die Zelle) der bindenden Rezeptoren machen zu können, wurde zusätzlich eine schwach fokussierende Zylinderlinse in den Detektionsstrahlengang eingefügt. Es wurde eine laterale Lokalisierungsgenauigkeit von durchschnittlich $\Delta x/y = 33\text{nm}$ erreicht. Die Lokalisierungsgenauigkeit des Abstandes in axialer Richtung zwischen Kernpore und Transportrezeptor betrug im Mittel $\Delta z = 120\text{nm}$. Aufgrund des guten Kontrastverhältnisses und der hohen Anregungsleistung der Laserbeleuchtung von 400mW (28mW an der Probe), konnte eine kurze Belichtungszeit von $t_{exp} = 2,1\text{ms}$ (476Hz) pro Bild (128x128 Pixel) verwendet werden. Durch die höhere Zeitauflösung im Vergleich zu bisherigen Studien (meist $t_{exp} \geq 5\text{ms}$) wird eine genauere Abbildung der Dynamik der Rezeptoren an der Kernpore ermöglicht.

In den Experimenten wurde eine stabile HeLa-Zelllinie verwendet, welche ein Fusionsprotein aus dem POM-121 Nukleoporin und dem grün fluoreszierenden Protein exprimiert. Die Signale der GFP-markierten POM-121 Nukleoporine, welche sich im Zentrum der Kernpore befinden [Sode 97], dienen hier zur Positionsbestimmung der Kernporen. Die Zellen wurden mittels einer Digitonin-Lösung permeabilisiert.

7.1 Bindungszeiten verschiedener Transportrezeptoren an der Kernpore

Die Auftragung der Bindungszeiten aller untersuchten freien und substratgebundenen Transportrezeptoren an der Kernpore ergab jeweils eine Exponentialverteilung. Aus der Anpassung einer Exponentialfunktion wurden dann die mittleren Bindungszeiten ermittelt.

Für den untersuchten Transportrezeptor NTF2 ergab sich eine Bindungszeit an der Kernpore von $3,4\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$, bzw. für den Transportkomplex NTF2+RanGDP eine Bindungszeit von $2,8\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 77). Diese Werte liegen um ca. 40% bzw. ca. 45% unter den zuvor ermittelten Werten von $5,8\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ bzw. $5,2\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ [Kubi 05]. Es zeigt sich aber auch hier eine kürzere Bindungszeit an der Kernpore für den substratgebundenen Transportrezeptor NTF2 im Vergleich zum freien. Möglicherweise verändert eine Bindung des Rezeptors an ein Substrat dessen Konformation derart, dass weniger Bindungsstellen vorhanden sind, welche stark mit der Kernpore interagieren, und somit eine schnellere Ablösung von der Kernpore erfolgt.

Die Verteilung der Bindungszeiten des Transportrezeptors Imp β 1 ergab eine mittlere Bindungszeit von $2,8\text{ms} \pm 0,1\text{ms}$ im freien Zustand, bzw. $2,7\text{ms} \pm 0,1\text{ms}$ im substratgebundenen Zustand. Der Wert für den freien Rezeptor liegt um ca. 57% unter dem zuvor ermittelten Wert von $6,6\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ [Dang 08], bzw. um ca. 44% unter dem von [Ma 10] gefundenen Wert von $4,9\text{ms} \pm 1,9\text{ms}$. Für die von Dange et. al. ermittelten Werte wurden die HeLa-Zellen nicht permeabilisiert, sondern die betrachteten Transportrezeptoren per Mikroinjektion in die Zelle eingebracht. Die dadurch noch im Zytosol vorhandenen Proteine und Transportprozesse können die beobachtete Bindungszeit an der Kernpore im Vergleich zu einer permeabilisierten Zelle beeinflussen, was eine mögliche Erklärung für den ermittelten Unterschied in den Bindungszeiten ist. Im Gegensatz zu NTF2 und Imp β 2 konnte nur ein geringer Unterschied zwischen den Bindungszeiten freier und substratgebundener Rezeptoren festgestellt werden.

Für den Transportrezeptor Imp β 2 ergaben sich die mittleren Bindungszeiten zu $2,9\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ bzw. $2,4\text{ms} \pm 0,1\text{ms}$ im freien bzw. substratgebundenen Zustand. Diese Werte liegen um ca. 60% bzw. ca. 57% unter den zuvor ermittelten Werten von $7,2\text{ms} \pm 0,3\text{ms}$ bzw. $5,6\text{ms} \pm 0,2\text{ms}$ [Kubi 05], und um ca. 48% unter dem gemessenen Wert für den freien Zustand von $4,6\text{ms} \pm 0,1\text{ms}$ [Dang 08]. Hier zeigt sich wieder eine kürzere Bindungszeit für den substratgebundenen Rezeptor, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus [Kubi 05].

Die generell niedrigeren Werte für die hier gefundenen Bindungszeiten, im Vergleich zu denen früherer Studien, sind vermutlich auf die höhere Zeitauflösung, sowie mögliche Fehlzuweisungen von ober- oder unterhalb der Kernpore befindlichen Transportrezeptoren zu Bindungsereignissen, zurückzuführen (siehe Abschnitt 6.1.2 auf Seite 63). Eine weitere mögliche Erklärung ist ein

7.1 Bindungszeiten verschiedener Transportrezeptoren an der Kernpore

schnellerer Transport, welcher durch eine Sättigung von halbkollabierten FG-Domänen in der Nähe der Wände des Kernporenkanals hervorgerufen wird. Dabei findet der Transport durch die Kernpore mit zwei Geschwindigkeiten statt; zum Einen langsam entlang der Wand des Kernporenkanals, zum Anderen schnell durch das Zentrum der Kernpore. Dieser Effekt wurde für Imp β 1 von Schoch et. al. [Scho 12] beobachtet. Die Sättigung der FG-Domänen könnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch die hochkonzentrierte Beigabe von unmarkiertem NTF2 erreicht worden sein.

Dass alle Bindungszeitverteilungen gut mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden können, lässt vermuten, dass ein einzelner geschwindigkeitslimitierender Schritt im Transportprozess durch die Pore verantwortlich ist. Möglicherweise ist die Separation des Rezeptors von der Pore dieser geschwindigkeitslimitierende Schritt. Dafür spricht z.B., dass auch sogenannte *probing*-Ereignisse an der Kernpore diese Verteilung aufweisen, und zwar sowohl an der zyto- als auch an der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore [Sieb 12]. Eine Studie zum Transport von β -actin mRNA zeigt ebenfalls lange Separationszeiten an der Kernpore, während der Transport durch den inneren Kanal der Pore in 5-20ms vergleichsweise schnell abläuft [Grun 10].

Der durch die Permeabilisierung der Zellen auftretende Verlust des natürlichen Zytosols wurde zum Teil kompensiert durch Beigabe eines ATP regenerierenden Systems. Dennoch ist ein Einfluss auf die beobachteten Bindungszeiten nicht auszuschließen, da z.B. kein Export von mRNA stattfindet, weil intranukleare Prozesse in permeabilisierten Zellen stark beeinträchtigt sind [Kues 01, Grun 06].

In früheren Studien wurden die Transportraten von Rezeptoren durch die Kernpore ermittelt. Für NTF2 wurden Transportraten von 2500 NTF2/s pro Kernpore [Ribb 01] und 1500 NTF2/s pro Kernpore [Sieb 02] bestimmt. Für Imp β 2 wurde eine Transportrate von 800 Imp β 2 /s pro Kernpore gefunden [Ribb 01]. Nimmt man einen einzelnen geschwindigkeitslimitierenden Schritt im Transportprozess an, dann kann die Transportrate nicht größer als das Inverse der Bindungszeit an der Kernpore sein (vgl. [Kubi 05]). Daher würden sich aus den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Bindungszeiten maximale Transportraten von 300 NTF2/s pro Kernpore für NTF2 (ungebunden) bzw. von 350 Imp β 2 /s pro Kernpore für Imp β 2 (ungebunden) ergeben. Um die hohen beobachteten Transportraten zu erklären kann man annehmen, dass verschiedene Transportprozesse durch die Kernpore simultan stattfinden [Yang 04, Kubi 05].

Die gemessenen Bindungszeiten lassen sich mit verschiedenen Transportmodellen vereinen. Nimmt man die Separation zwischen Kernpore und Rezeptor als geschwindigkeitslimitierenden Schritt an, bei schnellem Transport durch den inneren Kanal, eignet sich das Modell des *Virtual Gating* besonders gut zur Beschreibung der Daten. Hier bildet die Bindung des Rezeptors an die FG-Repeats auf der zyto- bzw. nukleoplasmatischen Seite den geschwindigkeitslimitierenden Schritt, wohingegen der Transport durch den inneren Kanal, welcher frei von Bindungsstellen an

FG-Repeats ist, schnell ist. Das Modell der *Reduction of Dimensionality* eignet sich ebenfalls gut zur Beschreibung von simultan stattfindenden Transportprozessen durch die Pore. Das gleiche gilt für das *Selective Phase* Modell (vgl. hierzu Abschnitt 2.1.2 auf Seite 6).

7.2 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren

7.2.1 Axiale Verteilungen

Die Auftragung der z-Positionen (in Richtung der Symmetrieachse des inneren Kanals der Kernpore) aller untersuchten freien und substratgebundenen Transportrezeptoren ergibt Verteilungen welche zentral um den Kernporenmittelpunkt verteilt sind, aber doch klare Bereiche erhöhter Aufenthaltswahrscheinlichkeit aufweisen. Jede der Verteilungen konnte gut mit einer Gaußfunktion angepasst werden, und somit der Mittelpunkt sowie die Breite der Verteilung bestimmt werden.

Der Transportrezeptor NTF2 hat sowohl im substratgebundenen als auch im freien Zustand das Maximum der Positionsverteilung auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore bei $x_c = -26nm \pm 2nm$ bzw. $x_c = -24nm \pm 3nm$ (siehe Abbn. 6.11a und 6.11b auf Seite 78). Diese Werte stimmen gut mit einem zuvor ermittelten Wert $x_c = -30nm$ für den freien Rezeptor NTF2 überein [Kubi 05]. Die Breiten (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) der Verteilungen betragen $164nm \pm 4nm$ bzw. $142nm \pm 6nm$ (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 77). Sie sind damit um ca. 30% größer als der in [Kubi 05] gemessene Wert von 125nm, für den freien Rezeptor. Ein Grund hierfür ist sicherlich die schlechtere Lokalisierungsgenauigkeit in axialer Richtung, gegenüber der lateralen Lokalisierungsgenauigkeit, welche in der genannten Studie ausschlaggebend war.

Die Mittelpunkte der Verteilungen des Transportrezeptors Imp β 1 liegen dichter am Zentrum der Kernpore bei $x_c = 5nm \pm 6nm$ bzw. $x_c = -13nm \pm 3nm$ (siehe Abbn. 6.11c und 6.11d auf Seite 78) für den freien bzw. substratgebundenen Rezeptor. Kahms et. al. fanden $x_c = -17nm$ für den substratgebundenen Rezeptor und $x_c = -14nm$ für den freien Rezeptor [Kahm 09]. Die Breite der Verteilungen ist deutlich kleiner (47nm bzw. 52nm), was auf die in diesem Experiment verwendete 4Pi-Mikroskopie zurückzuführen ist. Dange et al. bestimmten die Lage des Mittelpunkts ebenfalls nahe dem Zentrum der Pore bei $x_c = -10nm \pm 2nm$, allerdings auf der zytoplasmatischen Seite für den freien Rezeptor [Dang 08]. Die Breite der Verteilung betrug $160nm \pm 5nm$, welche mit der hier gefundenen Breite von $165nm \pm 14nm$ für den freien, bzw $156nm \pm 7nm$ für den substratgebundenen Rezeptor gut übereinstimmt.

Für den Transportrezeptor Imp β 2 wurde ein Unterschied in den Verteilungen festgestellt. Der freie Transportrezeptor Imp β 2 hat den Mittelpunkt der Verteilung auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran bei $x_c = -10nm \pm 3nm$, der substratgebundene hingegen auf der nukleoplasmatischen Seite bei $x_c = 20nm \pm 4nm$ (siehe Abbn. 6.11e und 6.11f auf Seite 78).

7.2 Räumliche Verteilung bindender Transportrezeptoren

Dange et al. bestimmten die Lage des Mittelpunkts hingegen nahe dem Zentrum der Pore bei $x_c = 5nm \pm 2nm$. Die Breite der Verteilungen wurde hier zu $168nm \pm 7nm$ bzw. $174nm \pm 10nm$ bestimmt, und ist damit um ca. 12 % größer als die von Dange et al. gemessene Breite von $150nm \pm 5nm$.

Nach der Permeabilisierung der Zelle und Inkubation mit der Transportrezeptorlösung befinden sich die Imp β 2 zunächst im Zytoplasma. Sie werden dann durch die Kernpore ins Nukleoplasma transportiert. Ein Unterschied im Transportverhalten durch die Kernpore für den freien Rezeptor im Gegensatz zu dem ans Substrat gebundenem sorgt dabei möglicherweise für die beiden unterschiedlichen Mittelpunktspositionen der Verteilungen. Dieser mögliche Unterschied im Transportverhalten wird auch im Vergleich der Bindungszeiten deutlich, welche für den substratgebundenen Rezeptor geringer sind als für den freien. Zu beachten ist, dass dieser Unterschied für NTF2 und Imp β 1 nicht beobachtet wird.

7.2.2 Radiale Verteilungen

Die radialen Verteilungen der Transportrezeptoren/Transportkomplexe beschreiben deren Abstand zum Mittelpunkt der Kernpore. Sie sind begrenzt auf den Bereich in 120nm um das Zentrum der Pore, welcher sich aus dem Selektionskriterium für Bindungsereignisse ergibt (siehe Abschnitt 5.3.3 auf Seite 58).

Für den Transportrezeptor NTF2 findet man Verteilungen, deren Maximum sich am Zentrum der Kernpore befindet. Der mittlere Abstand zum Zentrum beträgt $\langle r \rangle = 45nm$ bzw. $\langle r \rangle = 40nm$ für den freien bzw. substratgebundenen Rezeptor. Für beide Zustände scheint sich der Rezeptor beim Transport also bevorzugt im Zentrum des Porenkanals aufzuhalten.

Die Verteilungen des Rezeptors Imp β 1 haben hingegen ein Maximum der Verteilung im Abstand zwischen 40-60nm vom Zentrum der Pore, wobei der mittlere Abstand für beide Zustände $\langle r \rangle = 58nm$ beträgt. Diese verschobenen Maxima (im Gegensatz zu NTF2) weisen möglicherweise auf Bindungen am Rand des Kernporenkanals während des Transports hin. Allerdings ist zu beachten, dass der Radius des inneren Kanals nur ca. 30nm beträgt. Eine Studie von Ma et al. zeigt die radialen Verteilungen für Imp β 1 beim Transport durch die Kernpore für verschiedene Schnittebenen entlang des Kernporenkanals [Ma 10]. Die Maxima der Verteilungen lagen dabei in einem minimalen Abstand von $\langle r \rangle = 23nm$ zum Porenzentrum für den Bereich in axialer Richtung von -20nm bis +30nm um das Zentrum der Pore in axialer Richtung. In Richtung der zyto- bzw. nukleoplasmatischen Seite nimmt der mittlere Abstand zum Porenzentrum zu. In der Studie von Ma et al. wurde eine Lokalisierungsgenauigkeit von 9nm erreicht, im Gegensatz zu der hier bestimmten mittleren Lokalisierungsgenauigkeit von 33nm.

Die radialen Verteilungen des Transportrezeptors Imp β 2 weist wiederum eine Verschiebung zum Zentrum der Kernpore auf. Für den freien Zustand werden zwei Maxima im Abstand von

0-20nm und 40-60nm gefunden. Für den substratgebundenen Zustand ein Maximum im Abstand zwischen 20-40nm. Der mittlere Abstand zum Zentrum beträgt $\langle r \rangle = 54nm$ bzw $\langle r \rangle = 55nm$ für den freien bzw. substratgebundenen Rezeptor. Auch hier weisen die verschobenen Maxima möglicherweise auf bevorzugte Bindungen am Rand des Kernporenkanals hin.

7.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels kontrastverstärkter Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie die Dynamik verschiedener freier und substratgebundener Transportrezeptoren am Kernporenkomplex untersucht. Dazu wurde ein Mikroskopaufbau mit TIRF- und HILO-Beleuchtung realisiert, welcher die Abbildung von supramolekularen Komplexen in situ mit Nanometerauflösung und im Millisekundenbereich ermöglicht.

Die gefundenen Ergebnisse zur Bindungszeit an der Kernpore bestätigen die Vermutung, dass substratgebundene Transportrezeptoren kürzere Bindungszeiten an der Kernpore aufweisen [Kubi 05]. Die gefundenen mittleren Bindungszeiten liegen alle unter den in früheren Studien ermittelten, was auf die höhere Zeitauflösung, sowie mögliche Fehlzuweisungen von ober- oder unterhalb der Kernpore befindlichen Transportrezeptoren zu Bindungsereignissen, zurückzuführen ist. Die gefundenen Verteilungen der Bindungsstellen von Transportrezeptoren entlang der Symmetrieachse der Kernpore entspricht in guter Übereinstimmung den Ergebnissen aus bisherigen Studien. Die radialen Verteilungen der Bindungsstellen, welche bisher kaum untersucht wurden, unterstützen die von Ma et al. gefundenen Ergebnisse, wonach Rezeptoren beim Transport durch die Pore am Rand des Porenkanals binden. Allerdings konnten diese aufgrund der schlechteren Lokalisierungsgenauigkeit nicht genauer bestimmt werden.

Die Methode der Betrachtung der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns anstelle der Äquators ermöglicht bei zusätzlicher Verwendung einer Zylinderlinse im Detektionsstrahlengang eine gleichzeitige Bestimmung der radialen und axialen Position eines bindenden Transportrezeptors an der Kernpore. Daraus können die Verteilungen der Bindungsstellen, sowie die Bindungszeiten gewonnen werden. Aufgrund der schlechten Lokalisierungsgenauigkeit in axialer Richtung ist die Abbildung eines kompletten Transportvorgangs durch die Kernpore allerdings nur schwer möglich. Durch die Abbildung der dem Deckglas zugewandten Unterseite des Zellkerns ist auch eine größere Anzahl von Kernporen gleichzeitig analysierbar. Dies führt zu einer besseren Statistik der gewonnenen Daten.

Bei der Verwendung von TIRF- und HILO-Beleuchtung kommt es aufgrund von Inhomogenitäten in der Probe und Aberrationen im Beleuchtungsstrahlengang zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Interferenzmustern in den Abbildungen. Eine mögliche Verbesserung des Aufbaus wäre die Einführung einer Mechanik, welche den in die hintere Fokusebene fokussierten Beleuch-

7.3 Fazit und Ausblick

tungsstrahl kreisförmig um die optische Achse bewegt [Hoff 08]. Dadurch wird der Fokuspunkt des Strahls in der Ebene der hinteren Fokusebene des Objektivs verfahren und somit die Probe aus verschiedenen Richtungen beleuchtet. Diese symmetrische TIRF- bzw. HILO-Beleuchtung resultiert in einer gleichmäßig beleuchteten Probe.

Zur weiterführenden Untersuchung der Dynamik von Transportrezeptoren an der Kernpore können nun weitere Rezeptoren mit unterschiedlichen Substraten analysiert werden. Eine mögliche Erweiterung der Experimente wäre auch die Mikroinjektion der zu untersuchenden Transportkomplexe anstelle einer Permeabilisation der Zellen. Schnellere und empfindlichere Kameras würden eine bessere Zeitauflösung der beobachteten Prozesse ermöglichen und auch die Lokalisierungsgenauigkeit erhöhen.

Literaturverzeichnis

- [Albe 08] B. M. Alberts *et al.* *Encyclopaedia Britannica*, Chap. Cell. Encyclopaedia Britannica, Inc., 2008.
- [Axel 01] D. Axelrod. “Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology”. *Traffic*, Vol. 2, No. 11, pp. 764–774, Nov 2001.
- [Axel 03] D. Axelrod. “Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology”. *Meth. Enzymol.*, Vol. 361, pp. 1–33, 2003.
- [Axel 84] D. Axelrod, T. P. Burghardt, and N. L. Thompson. “Total Internal Reflection Fluorescence”. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, Vol. 13, No. 1, pp. 247–268, 1984.
- [Babc 04] H. P. Babcock, C. Chen, and X. Zhuang. “Using single-particle tracking to study nuclear trafficking of viral genes”. *Biophys. J.*, Vol. 87, No. 4, pp. 2749–2758, Oct 2004.
- [Bayl 99] R. Bayliss, K. Ribbeck, D. Akin, H. M. Kent, C. M. Feldherr, D. Gorlich, and M. Stewart. “Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP”. *J. Mol. Biol.*, Vol. 293, No. 3, pp. 579–593, Oct 1999.
- [Betz 06] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”. *Science*, Vol. 313, No. 5793, pp. 1642–1645, Sep 2006.
- [Bobr 86] N. Bobroff. “Position measurement with a resolution and noise-limited instrument”. *Review of Scientific Instruments*, Vol. 57, No. 6, pp. 1152–1157, 1986.
- [Bodo 99] K. Bodoor, S. Shaikh, D. Salina, W. H. Raharjo, R. Bastos, M. Lohka, and B. Burke. “Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis”. *J. Cell. Sci.*, Vol. 112 (Pt 13), pp. 2253–2264, Jul 1999.

- [Born 97] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Cambridge University Press, 1997.
- [Chai 00] C. Chaillan-Huntington, C. V. Braslavsky, J. Kuhlmann, and M. Stewart. “Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats”. *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, No. 8, pp. 5874–5879, Feb 2000.
- [Cron 02] J. M. Cronshaw, A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait, and M. J. Matunis. “Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex”. *J. Cell Biol.*, Vol. 158, No. 5, pp. 915–927, Sep 2002.
- [Dang 08] T. Dange, D. Grunwald, A. Grunwald, R. Peters, and U. Kubitscheck. “Autonomy and robustness of translocation through the nuclear pore complex: a single-molecule study”. *J. Cell Biol.*, Vol. 183, No. 1, pp. 77–86, Oct 2008.
- [DeSa 12] M. C. DeSantis, S. K. Zareh, X. Li, R. E. Blankenship, and Y. M. Wang. “Single-image axial localization precision analysis for individual fluorophores”. *Opt Express*, Vol. 20, No. 3, pp. 3057–3065, Jan 2012.
- [Gorl 96] D. Görlich and I. W. Mattaj. “Nucleocytoplasmic transport”. *Science*, Vol. 271, No. 5255, pp. 1513–1518, Mar 1996.
- [Grun 06] D. Grunwald, B. Spottke, V. Buschmann, and U. Kubitscheck. “Intranuclear binding kinetics and mobility of single native U1 snRNP particles in living cells”. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 17, No. 12, pp. 5017–5027, Dec 2006.
- [Grun 10] D. Grunwald and R. H. Singer. “In vivo imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport”. *Nature*, Vol. 467, No. 7315, pp. 604–607, Sep 2010.
- [Hech 01] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg, 2001.
- [Heim 95] R. Heim, A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. “Improved green fluorescence”. *Nature*, Vol. 373, No. 6516, pp. 663–664, Feb 1995.
- [Hell 94] S. W. Hell and J. Wichmann. “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”. *Opt Lett*, Vol. 19, No. 11, pp. 780–782, Jun 1994.
- [Hoel 11] A. Hoelz, E. W. Debler, and G. Blobel. “The structure of the nuclear pore complex”. *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 80, pp. 613–643, Jun 2011.

- [Hoff 08] M. van 't Hoff, V. de Sars, and M. Oheim. “A programmable light engine for quantitative single molecule TIRF and HILO imaging”. *Opt Express*, Vol. 16, No. 22, pp. 18495–18504, Oct 2008.
- [Holt 07] L. Holtzer, T. Meckel, and T. Schmidt. “Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells”. *Applied Physics Letters*, Vol. 90, No. 5, pp. 053902–053902–3, Jan 2007.
- [Huis 04] J. Huiskens, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. Stelzer. “Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy”. *Science*, Vol. 305, No. 5686, pp. 1007–1009, Aug 2004.
- [Isgr 07] T. A. Isgro and K. Schulten. “Association of nuclear pore FG-repeat domains to NTF2 import and export complexes”. *J. Mol. Biol.*, Vol. 366, No. 1, pp. 330–345, Feb 2007.
- [Kahm 09] M. Kahms, P. Lehrich, J. Huve, N. Sanetra, and R. Peters. “Binding site distribution of nuclear transport receptors and transport complexes in single nuclear pore complexes”. *Traffic*, Vol. 10, No. 9, pp. 1228–1242, Sep 2009.
- [Kahm 11] M. Kahms, J. Huve, R. Wesselmann, J. C. Farr, V. Baumgartel, and R. Peters. “Lighting up the nuclear pore complex”. *Eur. J. Cell Biol.*, Vol. 90, No. 9, pp. 751–758, Sep 2011.
- [Kao 94] H. P. Kao and A. S. Verkman. “Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position”. *Biophys. J.*, Vol. 67, No. 3, pp. 1291–1300, Sep 1994.
- [Kemi 99] O. Keminer, J. P. Siebrasse, K. Zerf, and R. Peters. “Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 96, No. 21, pp. 11842–11847, Oct 1999.
- [Khos 83] J. M. Khosrofian and B. A. Garetz. “Measurement of a Gaussian laser beam diameter through the direct inversion of knife-edge data”. *Appl Opt*, Vol. 22, No. 21, pp. 3406–3410, Nov 1983.
- [Kono 08] C. A. Konopka and S. Y. Bednarek. “Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex”. *Plant J.*, Vol. 53, No. 1, pp. 186–196, Jan 2008.

- [Kram 07] A. Kramer, Y. Ludwig, V. Shahin, and H. Oberleithner. “A pathway separate from the central channel through the nuclear pore complex for inorganic ions and small macromolecules”. *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, No. 43, pp. 31437–31443, Oct 2007.
- [Kubi 05] U. Kubitscheck, D. Grunwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J. P. Siebrasse, and R. Peters. “Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex”. *J. Cell Biol.*, Vol. 168, No. 2, pp. 233–243, Jan 2005.
- [Kubi 96] U. Kubitscheck, P. Wedekind, O. Zeidler, M. Grote, and R. Peters. “Single nuclear pores visualized by confocal microscopy and image processing”. *Biophys. J.*, Vol. 70, No. 5, pp. 2067–2077, May 1996.
- [Kues 01] T. Kues, A. Dickmanns, R. Luhrmann, R. Peters, and U. Kubitscheck. “High intra-nuclear mobility and dynamic clustering of the splicing factor U1 snRNP observed by single particle tracking”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 98, No. 21, pp. 12021–12026, Oct 2001.
- [Lim 06] R. Y. Lim and B. Fahrenkrog. “The nuclear pore complex up close”. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. 18, No. 3, pp. 342–347, Jun 2006.
- [Ma 10] J. Ma and W. Yang. “Three-dimensional distribution of transient interactions in the nuclear pore complex obtained from single-molecule snapshots”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 107, No. 16, pp. 7305–7310, Apr 2010.
- [Mash 03] G. I. Mashanov, D. Tacon, A. E. Knight, M. Peckham, and J. E. Molloy. “Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy”. *Methods*, Vol. 29, No. 2, pp. 142–152, Feb 2003.
- [Merr 99] C. J. Merrifield, S. E. Moss, C. Ballestrem, B. A. Imhof, G. Giese, I. Wunderlich, and W. Almers. “Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells”. *Nat. Cell Biol.*, Vol. 1, No. 1, pp. 72–74, May 1999.
- [Mert 00] J. Mertz. “Radiative absorption, fluorescence, and scattering of a classical dipole near a lossless interface: a unified description”. *J. Opt. Soc. Am. B*, Vol. 17, No. 11, pp. 1906–1913, Nov 2000.
- [Morr 03] J. Morrison, J. C. Yang, M. Stewart, and D. Neuhaus. “Solution NMR study of the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats”. *J. Mol. Biol.*, Vol. 333, No. 3, pp. 587–603, Oct 2003.

- [Naim 07] B. Naim, V. Brumfeld, R. Kapon, V. Kiss, R. Nevo, and Z. Reich. “Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled”. *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, No. 6, pp. 3881–3888, Feb 2007.
- [Newp 13] Newport. “Spatial Filters”. <http://www.newport.com/Spatial-Filters/144910/1033/content.aspx>, 2013.
- [Pant 02] N. Pante and M. Kann. “Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm”. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 13, No. 2, pp. 425–434, Feb 2002.
- [Pemb 05] L. F. Pemberton and B. M. Paschal. “Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export”. *Traffic*, Vol. 6, No. 3, pp. 187–198, Mar 2005.
- [Pete 05] R. Peters. “Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality”. *Traffic*, Vol. 6, No. 5, pp. 421–427, May 2005.
- [Pete 07] R. Peters. “Single-molecule fluorescence analysis of cellular nanomachinery components”. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, Vol. 36, pp. 371–394, 2007.
- [Pieh 00] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, and G. Gauglitz. “A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces”. *Biosens Bioelectron*, Vol. 15, No. 9-10, pp. 473–481, 2000.
- [Reic 90] R. Reichelt, A. Holzenburg, E. L. Buhle, M. Jarnik, A. Engel, and U. Aebi. “Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components”. *J. Cell Biol.*, Vol. 110, No. 4, pp. 883–894, Apr 1990.
- [Ribb 01] K. Ribbeck and D. Gorlich. “Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes”. *EMBO J.*, Vol. 20, No. 6, pp. 1320–1330, Mar 2001.
- [Ritt 10] J. G. Ritter, R. Veith, A. Veenendaal, J. P. Siebrasse, and U. Kubitscheck. “Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue”. *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 7, Jul 2010.
- [Rout 00] M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait. “The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism”. *J. Cell Biol.*, Vol. 148, No. 4, pp. 635–651, Feb 2000.
- [Rout 03] M. P. Rout, J. D. Aitchison, M. O. Magnasco, and B. T. Chait. “Virtual gating and nuclear transport: the hole picture”. *Trends Cell Biol.*, Vol. 13, No. 12, pp. 622–628, Dec 2003.

- [Sche 11] K. Scherer. 2011. Skizze einer biotinylierten PEG-Schicht.
- [Scho 12] R. Schoch, L. Kapinos, and R. Lim. “Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG-nucleoporin molecular brushes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 109, No. 42, pp. 16911–16916, Oct 2012.
- [Sieb 02] J. P. Siebrasse and R. Peters. “Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes”. *EMBO Rep.*, Vol. 3, No. 9, pp. 887–892, Sep 2002.
- [Sieb 12] J. P. Siebrasse, T. Kaminski, and U. Kubitscheck. “Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 109, No. 24, pp. 9426–9431, Jun 2012.
- [Sode 97] H. Soderqvist, G. Imreh, M. Kihlmark, C. Linnman, N. Ringertz, and E. Hallberg. “Intracellular distribution of an integral nuclear pore membrane protein fused to green fluorescent protein—localization of a targeting domain”. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 250, No. 3, pp. 808–813, Dec 1997.
- [Stew 00] M. Stewart. “Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking using nuclear transport factor 2 (NTF2)”. *Cell Struct. Funct.*, Vol. 25, No. 4, pp. 217–225, Aug 2000.
- [Stey 97] J. A. Steyer, H. Horstmann, and W. Almers. “Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells”. *Nature*, Vol. 388, No. 6641, pp. 474–478, Jul 1997.
- [Sun 08] C. Sun, W. Yang, L. C. Tu, and S. M. Musser. “Single-molecule measurements of importin alpha/cargo complex dissociation at the nuclear pore”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 105, No. 25, pp. 8613–8618, Jun 2008.
- [Thom 02] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb. “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes”. *Biophys. J.*, Vol. 82, No. 5, pp. 2775–2783, May 2002.
- [Toku 08] M. Tokunaga, N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa. “Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells”. *Nat. Methods*, Vol. 5, No. 2, pp. 159–161, Feb 2008.
- [Topr 06] E. Toprak, J. Enderlein, S. Syed, S. A. McKinney, R. G. Petschek, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin. “Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 103, No. 17, pp. 6495–6499, Apr 2006.

- [Tsie 98] R. Y. Tsien. “The green fluorescent protein”. *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 67, pp. 509–544, 1998.
- [Tu 11] L. C. Tu and S. M. Musser. “Single molecule studies of nucleocytoplasmic transport”. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1813, No. 9, pp. 1607–1618, Sep 2011.
- [Waza 05] T. Wazawa and M. Ueda. “Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience”. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Vol. 95, pp. 77–106, 2005.
- [Yama 10] J. Yamada, J. L. Phillips, S. Patel, G. Goldfien, A. Calestagne-Morelli, H. Huang, R. Reza, J. Acheson, V. V. Krishnan, S. Newsam, A. Gopinathan, E. Y. Lau, M. E. Colvin, V. N. Uversky, and M. F. Rexach. “A bimodal distribution of two distinct categories of intrinsically disordered structures with separate functions in FG nucleoporins”. *Mol. Cell Proteomics*, Vol. 9, No. 10, pp. 2205–2224, Oct 2010.
- [Yang 04] W. Yang, J. Gelles, and S. M. Musser. “Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 101, No. 35, pp. 12887–12892, Aug 2004.
- [Yang 06] W. Yang and S. M. Musser. “Nuclear import time and transport efficiency depend on importin beta concentration”. *J. Cell Biol.*, Vol. 174, No. 7, pp. 951–961, Sep 2006.
- [Yang 11] W. Yang. “‘Natively unfolded’ nucleoporins in nucleocytoplasmic transport: clustered or evenly distributed?”. *Nucleus*, Vol. 2, No. 1, pp. 10–16, 2011.
- [Yang 98] Q. Yang, M. P. Rout, and C. W. Akey. “Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications”. *Mol. Cell*, Vol. 1, No. 2, pp. 223–234, Jan 1998.

Abkürzungsverzeichnis

AOTF	<i>Acousto-Optical Tunable Filter</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
a.u.	<i>Arbitrary Units</i>
EMCCD	<i>Electron Multiplying Charge Coupled Device</i>
EPI	Auflicht-Mikroskopie
FG-Repeat	Phenylalanin-Glycin Kette
FWHM	Halbwertsbreite (<i>Full Width at Half Maximum</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HILO	<i>Highly Inclined Laminated Optical sheet</i>
NES	Kernexportsignal (<i>Nuclear Export Signal</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
POM	Porenmembranprotein (<i>Pore Membrane Protein</i>)
PSF	Punktspreizfunktion (<i>Point Spread Function</i>)
TIRF	Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (<i>Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)</i>)

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau einer eukaryotischen Zelle (modifiziert, aus [Albe 08]). . .	4
2.2	Skizze des Kernporenkomplexes und seiner Bestandteile (Grafik modifiziert nach [Hoel 11]).	5
2.3	Verschiedene Transportzyklen des Kern-Zytoplasma-Transports	6
2.4	Skizzen verschiedener Modelle des Kern-Zytoplasma-Transports	7
2.5	Aufnahmen einer HeLa-Zelle deren Kernporen mit GFP markiert sind.	9
2.6	HILO Strahlengang durch eine Zelle	10
3.1	Skizze des Einzelmolekülaufbaus mit Lasereinkopplung und Strahlengang.	14
3.2	Brechung eines Lichtstrahls beim Übergang in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex $n_2 < n_1$	16
3.3	Zusammenhang zwischen dem Öffnungswinkel α der numerischen Apertur und dem Einfallswinkel θ	18
3.4	Amplituden des elektrischen Feldes parallel zur Einfallsebene.	21
3.5	Intensitäten der parallelen und senkrechten Anteile der evaneszenten Welle an der Grenzfläche in Abhängigkeit vom Einfallswinkel.	23
3.6	EPI/HILO Strahlengang durch das Objektiv.	24
3.7	Ausdehnung des HILO-Strahls, übernommen aus [Toku 08].	25
3.8	Skizze eines Gaußstrahls.	26
3.9	HILO-Strahlengang durch die vordere Fokusebene (VFE).	27
4.1	Skizze des Strahlengangs im HILO-Aufbau.	30
4.2	Abbildung der mit GFP markierten Kernporen einer HeLa-Zelle.	31
4.3	Abbildungen von immobilisierten markierten Mikropartikeln zur Illustration der SRV-Verbesserung	32
4.4	Darstellung des HILO-Strahls mit gaussförmigem Profil und Divergenz.	32
4.5	Skizzierung der Knife-Edge-Methode.	33
4.6	Abbildung des durch die Irisblende begrenzten Beleuchtungsflecks.	34
4.7	Der Intensitätsverlauf aufgetragen gegen die relative z-Position der Rasierklinge für verschiedene x-Positionen.	35

4.8	Halbwertsbreite und Höhe des HILO-Strahls für verschiedene x-Positionen.	36
4.9	Intensitätsprofile für versch. Feldblenden und Objektivpositionen.	36
4.10	Darstellung der Änderung der Höhe des HILO-Strahls bei Änderung der Objektivposition relativ zum Deckglas.	37
4.11	Skizze des HILO-Aufbaus mit eingefügter Zylinderlinse zwischen Notchfiltern und Tubuslinse.	40
4.12	Veränderung der PSF eines markierten Mikropartikels in Abhängigkeit der z-Position.	40
4.13	Kalibrationskurve der $\frac{w_x}{w_y}$ zur Bestimmung der z-Position, ermittelt mit 200nm Mikropartikeln.	41
4.14	Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung.	42
4.15	Kalibrationskurven für die Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546 von jeweils drei Neutravidin-Molekülen.	43
4.16	Detektierte Intensität von Tetraspecks für verschiedene Positionen der Fokusebene entlang der optischen Achse.	46
4.17	Bindung der Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546 über Neutravidin an eine biotinylierte PEG-Schicht auf dem Deckglas	46
4.18	Darstellung der Intensitätsprofile entlang der z-Richtung für die beiden Farbstoffe Atto488 und AlexaFluor546.	47
5.1	Spektren von GFP, Atto488 und AF546.	51
5.2	Kolokalisation der Signale von GFP und AlexaFluor546 an den Kernporen.	52
5.3	Bilder eines an die Kernpore bindenden NTF2 Transportrezeptors	54
5.4	Verteilung der Intensitäten und Intensitätsverlauf eines Unterbildstapels	57
5.5	Darstellung einzelner Bindungsereignisse in einem Übersichtsprogramm (in Matlab).	59
6.1	Aufnahmen einer HeLa-Zelle unter EPI- und HILO-Beleuchtung	61
6.2	Übersichtsbild und Bilder eines bindenden Transportrezeptors.	64
6.3	Bindungszeitverteilung der Transportrezeptors NTF2 (mit Schwellenwertfaktor n=8).	65
6.4	Verteilungen der Bindungszeiten der unterschiedlichen Transportrezeptoren für den Schwellenwertfaktor n=8 mit angepassten Exponentialfunktionen.	66
6.5	Verteilungen der Anpassungsgüte R^2 für verschiedene Schwellenwertfaktoren n.	67
6.6	Anzahl der Bindungsereignisse in Abhängigkeit des Schwellenwertfaktors n.	69
6.7	Mittlere Bindungszeit der Transportrezeptoren/komplexe für verschiedene Schwellenwertfaktoren n.	70

Abbildungsverzeichnis

6.8	Verteilung der Lokalisierungsgenauigkeiten der Transportrezeptoren in den drei Raumrichtungen.	72
6.9	Korrelation zwischen der Anpassungsgüte R^2 und der Lokalisierungsgenauigkeit in z-Richtung.	74
6.10	Verteilungen der radialen Abstände verschiedener Transportrezeptoren in Relation zum Zentrum der Kernpore.	75
6.11	Verteilungen der z-Positionen verschiedener Transportrezeptoren in Relation zum Zentrum der Kernpore.	78

Tabellenverzeichnis

4.1	Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Feldblenden an der Position $x=0$. .	37
4.2	Theoretisch berechnete und experimentell gemessene Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Objektivpositionen.	38
4.3	Halbwertsbreiten des Strahls für verschiedene Wellenlängen.	39
6.1	Bindungszeiten und Bindungspositionsverteilung der verschiedenen Transportre- zeptoren/komplexe für den Schwellenwertfaktor $n=8$. Negative Werte für das Zen- trum x_c der Bindungspositionsverteilung liegen im Zytoplasma, positive im Zellkern.	77

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Kubitscheck bedanken für die Möglichkeit, an einem herausfordernden Thema in einer interdisziplinären Arbeitsgruppe arbeiten zu können. Seine Unterstützung während meiner Promotion und sein Rat bei Fragestellungen zu meinem Thema haben mir sehr geholfen.

Prof. Dr. Merkel danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation.

Meinem langjährigen Kommilitonen und ehemaligen Bürokollegen Jörg Ritter danke ich für die gute Zusammenarbeit und anregende Diskussionen zu wissenschaftlichen und anderen interessanten Themen. Bei Fragen zur Feinjustage im Optiklabor war er immer eine große Hilfe.

Katharina Scherer möchte ich danken für ihre Hilfe bei chemischen Fragestellungen, für die schöne gemeinsame Zeit im Büro und insbesondere auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Julia Höckling und Claudio Nietzel möchte ich danken für ihre Hilfe im Labor und die Versorgung der HeLa-Zellen.

Fürs Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bedanken bei Jan-Hendrik Spille, Dr. Jan-Peter Siebrasse, Tim Kaminski und Eugen Baumgart.

Ich möchte Werner Wendler danken für die immer freundliche Zusammenarbeit und seine Hilfe bei der Realisierung verschiedener feinmechanischer Mikroskopkomponenten.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Biophysikalische Chemie“ für die freundliche und kollegiale Atmosphäre, und ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich danken für die fortwährende Unterstützung während meiner Promotion. Ihre Verlässlichkeit und Motivierung haben mir sehr geholfen.